

CRISTINE RODRIGUES

**Produção, extração e Purificação de Hormônio Vegetal (Ácido Giberélico)
por Fermentação no Estado Sólido em Polpa Cítrica e Utilização do
Extrato Fermentado em Meio de Cultivo de Bromélias *in vitro***

Curitiba
2010

CRISTINE RODRIGUES

**Produção, extração e Purificação de Hormônio Vegetal (Ácido Giberélico)
por Fermentação no Estado Sólido em Polpa Cítrica e Utilização do
Extrato Fermentado em Meio de Cultivo de Bromélias *in vitro***

Tese apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de Doutora
em Processos Biotecnológicos, área
de concentração Agroindústria, da
Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Dra. Luciana P. S.
Vandenberghe

Co-Orientador: Dr. Carlos R. Soccol

Curitiba

2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, exemplos de força e honestidade, meu amor e admiração.

À Professora Dr^a. Luciana Porto de Souza Vandenberghe por sua orientação, paciência e apoio em todos os momentos na execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela co-orientação e apoio constantes.

Ao Professor Dr. Márcio Alves Ferreira, à Dr^a. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros e à Dr^a Cristina Maria Monteiro Machado, por tão gentilmente aceitarem participar da banca de defesa desta tese.

A Mitiyo pelo auxílio prestado durante os trabalhos realizados.

Aos melhores estagiários: Juliana Teodoro, Juliana Oss, Mathias e Felipe, muito obrigado.

À Michele, Valesca, Sidnei, André, Mário, Juliana Oliveira e Wilerson pela ajuda e descontração, obrigada.

Ao Alex e pessoal do LPH pela ajuda e amizade, muito obrigada.

Aos colegas de trabalho e professores do Laboratório de Processos Biotecnológicos pela cooperação e auxílio.

Aos meus familiares, em especial minha avó Regina que rezou e, tenho certeza, ainda olha por mim, muita saudade.

Ao Edgar pelo carinho, incentivo incondicional e infinita paciência, todo meu amor.

A CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de doutorado.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pela estrutura necessária á realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
SUMARIO	2
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIações	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	19
OBJETIVOS GERAIS	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1. As Giberelinas	20
1.1 Histórico	21
1.2 Propriedades Químicas das Giberelinas	22
1.3 Biossíntese das Giberelinas	24
1.3.1 Aspectos Genéticos	29
1.4 Interações das Giberelinas	30
1.4.1 Com plantas	30
1.4.2 Com o microrganismo produtor, algas e animais	31
2. O Ácido Giberélico	32
2.1 Propriedades Físicas, Químicas e Biológicas do GA ₃	32
2.2 Utilização Comercial e Potencial do GA ₃	33
3. Processos de Produção do GA₃	34
3.1 Fermentação no Estado Sólido (FES)	36
3.1.1 Substratos	38
3.2 Microrganismos	43
4. Fatores Físico-Químicos que Influenciam a Produção de GA₃	45
4.1 pH	45
4.2 Temperatura	45
4.3 Umidade	46

4.4 Atividade de água (aw)	46
4.5 Aeração	47
5. Fatores Nutricionais que Influenciam a Produção de GA₃	48
5.1 Fontes de Nitrogênio	48
5.2 Fontes de Carbono	49
5.3 Sais Minerais e Elementos-traço	49
6. Extração, Análise e Purificação do GA₃	51
6.1 Extração e Quantificação do GA ₃	51
6.2 Purificação do GA ₃	54
7. Referências	56
 CAPÍTULO I - Seleção de Cepa e Substrato/Suporte para Produção de GA₃ por Fermentação no Estado Sólido	 70
Resumo	70
1. Introdução	71
2. Material e Métodos	72
2.1 Microrganismos	72
2.2 Substratos/Suportes	72
2.3 Fermentação no Estado Sólido (FES)	72
2.4 Caracterização do Substrato/Suporte - PC	73
2.4.1 Cátions e ânions	74
2.5 Extração e Análise	75
3. Resultados e Discussão	76
3.1 Seleção de Cepas e Substratos/Suportes para Produção do GA ₃ por FES	76
3.2 Caracterização Físico-Química da PC	80
3.2.1 Cátions e ânions	81
3.3 Otimização da Extração e Estudo da Análise por Espectrofotometria	82
3.3.1 Relação massa de fermentado e volume de tampão fosfato de sódio	82
3.3.2 Mecanismos de extração, pH do tampão fosfato de sódio e tempo de extração	83
3.3.3 Tempo de acidificação	86
4. Conclusões	87
5. Referências	88

CAPÍTULO II - Desenvolvimento do Meio de Produção de Inoculo e Otimização do Processo de Produção de GA₃ por FES Utilizando PC como Substrato/Suporte	91
Resumo	91
1. Introdução	92
2. Material e Métodos	92
2.1 Desenvolvimento do Meio de Produção do Inoculo	93
2.2 Viabilidade Celular	95
2.2.1 Testes com inoculo produzido em extrato de PC	95
2.3 FES Durante Seleção do Meio de Produção de Inoculo	96
2.4 Planejamentos Experimentais	96
2.4.1 Otimização das Variáveis Físico-Químicas de Produção de GA ₃	96
2.4.2 Otimização da Composição da Solução Nutritiva	98
2.5 Produção de GA ₃ em Biorreatores do Tipo Coluna com Aeração Forçada	100
3. Resultados e Discussão	103
3.1 Desenvolvimento do Meio de Produção de Inoculo	103
3.2 Otimização das Variáveis Físico-Químicas de Produção de GA ₃	109
3.3 Otimização da Composição da Solução Nutritiva	115
3.4 Cinética Final em Frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão)	120
3.5 Produção de GA ₃ em Biorreatores do Tipo Coluna com Aeração Forçada	123
3.6 Cinética em Colunas de Vidro com Aeração Forçada	127
3.7 Desenvolvimento da Produção de GA ₃ Durante o Processo de Otimização	132
4. Conclusões	134
5. Referências	134
 CAPÍTULO III - Estudos da Purificação do GA₃ Presente no Extrato Fermentado de PC por <i>Fusarium moniliforme</i> LPB 03	 137
Resumo	137
1. Introdução	138
2. Material e Métodos	138
2.1 Produção do Inóculo de <i>F. moniliforme</i> LPB 03	139
2.2 Produção de GA ₃ por FES	139
2.3 Obtenção do Extrato Fermentado (EF)	139

2.4 Estudo da Purificação do GA ₃	140
2.4.1 Estudo da extração do GA ₃ com acetato de etila	141
2.4.2 Clarificação do EF	142
2.5 Concentração	144
2.6 Análises	145
3. Resultados e Discussão	145
3.1 Estudo da Precipitação de Macromoléculas	145
3.2 Estudo da Purificação do GA ₃	146
3.2.1 Clarificação do EF	149
4. Conclusões	162
5. Referências	163
 CAPÍTULO IV – Estudo da Utilização do Extrato Fermentado da Polpa Cítrica por <i>F. moniliforme</i> LPB 03 em Bioensaios com Espécies de Bromélia Cultivadas <i>In Vitro</i>	164
Resumo	164
1. Introdução	165
2. Material e Métodos	166
2.1 Ensaio Biológico com Culturas de Bromélias	166
2.1.1 Obtenção das culturas de bromélias	166
2.1.2 Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	167
2.1.3 Condições de cultura e análise estatística	167
2.2 Estabilidade do EF a Temperatura Ambiente	167
3. Resultados e Discussão	168
3.1 Ensaio Biológico com Culturas de Bromélias	168
3.2 Estabilidade do EF a Temperatura Ambiente	173
4. Conclusões	174
5. Referências	174
 CONCLUSÕES GERAIS	176
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Aplicações do ácido giberélico	33
Tabela 2	- Diferentes estratégias de produção de GA₃ por FES utilizando resíduos e/ou subprodutos	35
Tabela 3	- Comparação entre FES e Fermentação Submersa	37
Tabela 4	- Composição química média da casca de café (base seca)	40
Tabela 5	- Propriedades do farelo de polpa cítrica	41
Tabela 6	- Composição do farelo de soja	42
Tabela 7	- Composição da casca de soja	42
Tabela 8	- Sais minerais utilizados na produção de GA₃ por fermentação	50
Tabela 9	- Condições de extração e análise de GA₃ – Espectrofotometria UV	51
Tabela 10	- Metodologias de extração e análise de ácido giberélico por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE	52
Tabela 11	- Níveis utilizados no planejamento experimental do tipo simplex-lattice para a escolha do substrato/suporte	73
Tabela 12	- Variáveis e respectivos níveis utilizados no planejamento experimental realizado na otimização da extração do GA₃ produzido	76
Tabela 13	- Resultados obtidos de produção de GA₃ por FES utilizando seis substratos e suas misturas para as cinco cepas estudadas	77
Tabela 14	- Quantidade de Nitrogênio Orgânico e Carboidratos totais dos substratos estudados	79
Tabela 15	- Características físico-químicas da PC utilizada	80
Tabela 16	- Resultados da quantificação de cátions presentes na PC utilizada	81
Tabela 17	- Resultados do estudo da relação massa do fermentado e volume do tampão fosfato utilizado na extração	82
Tabela 18	- Anova da otimização da extração de GA₃ do material fermentado	83
Tabela 19	- Resultados do Estudo de quantidade de GA₃ extraído utilizando diferentes pHs, formas e tempos de agitação	85
Tabela 20	- Planejamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central para as variáveis:	97

	pH, umidade, temperatura, taxa de inoculação e granulometria	
Tabela 21	- Planejamento experimental do tipo DCCR para as variáveis umidade e granulometria ($2^2 + 4$ ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central)	98
Tabela 22	- Primeiro planejamento experimental para a solução nutritiva: tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central para 6 variáveis	99
Tabela 23	- Segundo planejamento experimental para a solução nutritiva: tipo DCCR para 2 variáveis ($2^2 + 4$ ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central)	100
Tabela 24	- Planejamento experimental do tipo 2^2 com 3 repetições no ponto central para colunas com aeração forçada	102
Tabela 25	- Contagem de células viáveis no inoculo produzido utilizando diferentes metodologias e meios de cultivo	104
Tabela 26	- Produção de GA_3 em FES utilizando diferentes meios de crescimento do inoculo	105
Tabela 27	- Produção de GA_3 com a utilização de diferentes concentrações de sacarose adicionado ao extrato de PC, utilizado como meio de produção de inoculo	107
Tabela 28	- Resultados do planejamento experimental realizado na primeira etapa de otimização para as variáveis: pH, umidade, temperatura, taxa de inoculação e granulometria	110
Tabela 29	- Resultados do experimento do tipo DCCR utilizado na segunda etapa da otimização das variáveis granulometria e umidade inicial	112
Tabela 30	- ANOVA da otimização das variáveis: umidade inicial e granulometria da PC	113
Tabela 31	- Resultados obtidos com os estudos da suplementação com fonte de nitrogênio e fonte de carbono	115
Tabela 32	- Resultados do primeiro planejamento experimental tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central para a otimização da composição da solução nutritiva	116
Tabela 33	- Resultados do segundo planejamento experimental para a solução nutritiva	118

Tabela 34	- ANOVA da otimização das variáveis da solução salina: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e uréia	118
Tabela 35	- Cinética da produção de GA_3 por <i>F. moniliforme</i> em FES utilizando PC em frascos de Erlenmeyer	120
Tabela 36	- Resultados do primeiro planejamento experimental do tipo 2^2 com 3 repetições no ponto central para colunas com aeração forçada	124
Tabela 37	- Resultados do segundo planejamento experimental do tipo 2^2 com 3 repetições no ponto central para colunas com aeração forçada	125
Tabela 38	- Resultados obtidos do acompanhamento da cinética de produção de GA_3 por <i>F. moniliforme</i> com PC em FES utilizando colunas de vidro com aeração forçada	127
Tabela 39	- Etapas estudadas e respectivos ganhos no processo de produção de GA_3 por FES	132
Tabela 40	- Planejamento experimental 3^2 com 3 repetições do ponto central para o estudo de extração do GA_3 do EF com acetato de etila	141
Tabela 41	- Planejamento experimental para o estudo de adsorção de GA_3 por diferentes tipos de carvão ativo	143
Tabela 42	- Resultados do estudo da recuperação do GA_3 após clarificação do EF por precipitação	145
Tabela 43	- Resultados do estudo de extração do GA_3 do EF para o acetato de etila	146
Tabela 44	- ANOVA dos resultados obtidos com o estudo da extração do GA_3 do EF com acetato de etila	147
Tabela 45	- Análise da porcentagem de GA_3 nos extratos tratados em coluna de C18	152
Tabela 46	- Análise da porcentagem de GA_3 em cada extrato passado pela coluna de XAD 16	155
Tabela 47	- Resultados do planejamento experimental para o estudo de adsorção de GA_3 por diferentes tipos de carvão ativo	156
Tabela 48	- Resultados da recuperação de GA_3 após passagem do EF por coluna de CA sob diferentes vazões	158
Tabela 49	- Resultados de absorbância das alíquotas coletadas após	159

passagem pela coluna de CA

Tabela 50 - Características observadas aos 50 dias de cultivo *in vitro* sob 169
concentrações de ácido giberélico (GA₃) (para análise) e ácido
giberélico presente no EF nas espécies *N. innocentii* e *N.*
procerum

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura do ent-giberelano (que dá origem à classe A das giberelinas) e do 20-nor ent-giberelano (que dá origem à classe B das giberelinas)	22
Figura 2	- Estrutura base das giberelinas e a numeração de seus átomos de carbono	23
Figura 3	- Estrutura química de algumas giberelinas	24
Figura 4	- Via de formação do mevalonato a partir da acetil- CoA	25
Figura 5	- Via bioquímica da concentração das unidades isoprênicas e formação do ent-caureno	26
Figura 6	- Via de formação do GA ₁₂ -aldeído	27
Figura 7	- Rotas metabólicas para formação de giberelinas	28
Figura 8	- Estrutura molecular do ácido giberélico	32
Figura 9	- Macro e Microconídeos em <i>Fusarium</i> . A-B Macroconídeos e C-D Microconídeos; Barra de escala de 25 µm	44
Figura 10	- Fotos de duas cepas cultivadas em meio BDA observadas ao microscópio ótico com aumento de 100X. A) <i>Giberella fujikuroi</i> LPB BCA (estágio sexuado) e B) <i>Fusarium moniliforme</i> LPB 03 (estágio assexuado)	76
Figura 11	- Diagrama de Pareto dos resultados obtidos do estudo de quantidade de GA ₃ extraído utilizando diferentes pHs, formas e tempos de agitação	84
Figura 12	- Espectro da transformação de ácido giberélico em ácido giberelênico por acidificação	86
Figura 13	- Estudo do tempo de acidificação na transformação de ácido giberélico em ácido giberelênico	87
Figura 14	- Esquema do estudo de diferentes meios de produção de inoculo de <i>F. moniliforme</i> LPB 03	93
Figura 15	- FES em colunas de vidro: 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4) colunas imersas em banho de água com controle de temperatura	101
Figura 16	- FES em colunas de vidro com análise de O ₂ e CO ₂ : 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4)	103

colunas imersas em banho de água com controle de temperatura; 5) estrutura contendo os sensores; 6) painel de controle; 7) computador para aquisição de dados e controle do software

Figura 17	- Diagrama de Pareto dos efeitos da adição de componentes do caldo Czapek no meio de extrato de PC	106
Figura 18	- Viabilidade celular do inoculo produzido em extrato de PC	107
Figura 19	- Estudo da viabilidade do inoculo de <i>F. moniliforme</i> LPB 03 produzido utilizando extrato de PC, após estocagem sob refrigeração	108
Figura 20	- Cinética de produção de GA ₃ por FES utilizando PC como substrato/suporte e <i>F. moniliforme</i> LPB 03	109
Figura 21	- Diagrama de Pareto originado dos resultados obtidos de produção de GA ₃ na primeira etapa de otimização de 5 variáveis do processo fermentativo	111
Figura 22	- Superfície de Resposta obtida com os resultados da otimização das variáveis: umidade inicial e granulometria da PC	114
Figura 23	- Digrama de Pareto dos resultados da etapa de otimização da solução nutritiva com 6 variáveis	117
Figura 24	- Superfície de Resposta obtida com os resultados da última etapa de otimização da composição da solução nutritiva	119
Figura 25	- Consumo de açúcares e formação de GA ₃ durante o processo fermentativo	121
Figura 26	- Perfil de crescimento do <i>F. moniliforme</i> em PC durante produção de GA ₃	122
Figura 27	- Desenvolvimento do pH e umidade durante o processo fermentativo de produção do GA ₃	123
Figura 28	- Superfície de resposta gerada com os resultados da primeira etapa de otimização da fermentação em colunas com aeração forçada	125
Figura 29	- Superfície de resposta gerada com os resultados da segunda etapa de otimização da fermentação em colunas com aeração forçada	126

Figura 30	- Comparação da produção de biomassa obtida com fermentação em frascos Erlenmeyer (aeração por difusão) e em colunas (aeração forçada)	128
Figura 31	- Consumo de açúcares e formação de GA ₃ durante o processo fermentativo em colunas de vidro com aeração forçada	129
Figura 32	- Produção de CO ₂ e consumo de O ₂ durante FES de produção de GA ₃ por FES com <i>F. moniliforme</i> LPB 03 e PC	130
Figura 33	- Cinética de produção de biomassa utilizando biorreator do tipo coluna de vidro com aeração forçada; A) biomassa estimada B) biomassa analisada por ergosterol	131
Figura 34	- Fluxograma das etapas desenvolvidas para clarificação e purificação do GA3 produzido por FES em PC	140
Figura 35	- Foto de colunas utilizadas para limpeza do EF: à esquerda coluna preenchida com resina XAD16 e à direita coluna preenchida com sílica C18	142
Figura 36	- Foto do sistema utilizado para o estudo da vazão na passagem do EF pela coluna de CA	144
Figura 37	- Superfície de resposta obtida com os resultados do estudo de pH do EF e número de extrações com acetato de etila	148
Figura 38	- Foto do fundo de béquer contendo EF após passagem para acetato de etila e concentração em estufa a vácuo	149
Figura 39	- Análise do EF por CLAE	149
Figura 40	- Análise de solução de GA ₃ padrão (99%, marca Akros) a 0,125 g/l realizada por CLAE	151
Figura 41	- Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela sílica C18	152
Figura 42	- Cromatograma do EF após passagem pela sílica C18, extração com acetato de etila, concentração e refrigeração	153
Figura 43	- Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela coluna de resina XAD16	154
Figura 44	- Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela coluna de resina XAD16, extraído com acetato de etila, concentrado e resfriado	155
Figura 45	- Foto dos extratos obtidos do estudo de tipo de carvão ativo,	157

	tempo de contato e velocidade de agitação. Tubos numerados segundo os ensaios do planejamento experimental	
Figura 46	- Foto do EF antes de passar pela coluna de CA (direita) e após a passagem pela coluna de CA (esquerda)	158
Figura 47	- Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela coluna contendo CA	160
Figura 48	- Cromatograma obtido do EF após passagem pela coluna contendo CA, extraído com acetato de etila, concentrado e resfriado	161
Figura 49	- Foto do fundo do copo de béquer contendo GA ₃ purificado	161
Figura 50	- Plantas micropropagadas de bromélias do gênero <i>Nidularium</i> sob diferentes níveis de ácido giberélico oriundo do extrato fermentado (EF) aos 50 dias de cultivo <i>in vitro</i> . (A) <i>Nidularium innocentii</i> e (B) <i>Nidularium procerum</i>	172
Figura 51	- Curva de estabilidade do EF representada em % de GA ₃ presente no EF no decorrer de 110 dias	173

LISTA DE ABREVIATÖES

GAs	Giberelinas
GA₃	Ácido giberélico
<i>F. moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>G. fujikuroi</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
PC	Polpa cítrica
CP	“Citric Pulp”
FES	Fermentação no Estado Sólido
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
a_w	Atividade de água
BDA	Meio batata dextrose ágar
EF	Extrato fermentado
CA	Carvão ativo ou ativado
PA	Reagente para análise
<i>N. innocentii</i>	<i>Nidularium innocentii</i>
<i>N. procerum</i>	<i>Nidularium procerum</i>
SSF	“Solid State Fermentation”
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultra Violeta
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RESUMO

O ácido giberélico (GA_3) é um importante regulador de crescimento vegetal, atuando principalmente sobre expansão e divisão celular. É produzido industrialmente por Fermentação Submersa, porém este processo já se apresenta próximo da saturação com altos custos de produção e, conseqüentemente, alto valor de venda. Sua produção através de Fermentação no Estado Sólido (FES) permite o reaproveitamento de resíduos agro-industriais, gerando um produto de custo menor. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo para a produção e purificação de GA_3 por FES. Para tal, realizou-se primeiramente a escolha da cepa (quatro de *Gibberella fujikuroi* e uma de *Fusarium moniliforme*) bem como do melhor meio de produção de inóculo e do suporte/substrato (polpa cítrica, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e casca de café). O fungo *Fusarium moniliforme* LPB 03 e a polpa cítrica (PC) foram escolhidos bem como a produção do inóculo a partir de extrato de PC, sendo que a produção nestas condições foi de 5,7 g de GA_3 /kg de PC seca. Foram realizadas otimizações das variáveis físico-químicas do processo de produção de GA_3 em frascos Erlenmeyer com posterior estudo da influência da aeração em colunas com aeração forçada. As variáveis estudadas em frascos Erlenmeyer foram temperatura, umidade inicial, granulometria do substrato, taxa de inóculo e pH, adição de fonte de carbono ou nitrogênio e sais de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), potássio KH_2PO_4 , ferro ($FeSO_4$) e zinco ($Zn_2SO_4 \cdot 7H_2O$). Com a finalização desta otimização obteve-se um aumento de 33,3 % na produção de GA_3 . Para as fermentações em coluna com aeração forçada foram otimizadas as variáveis umidade e aeração. Após a realização dos planejamentos experimentais foram obtidos 0,053 g de GA_3 /kg de PC seca. h^{-1} para frascos Erlenmeyer e 0,061 g GA_3 /kg de PC seca. h^{-1} . O extrato obtido da fermentação (EF) foi submetido a testes para clarificação e purificação do GA_3 , onde foram testados sílica C18, resina XAD 16 e diferentes tipos de carvão ativo. Os melhores resultados foram obtidos com utilizando tratamento em carvão ativo pulverizado, com 69,2% de recuperação do GA_3 . O EF foi testado quanto a sua estabilidade a temperatura ambiente e utilização como fonte de GA_3 adicionado ao meio de crescimento de duas espécies de bromélia. O EF se apresentou bastante estável com menos de 10% de diminuição na concentração de GA_3 após 110 dias de armazenamento. Os testes biológicos com bromélia apresentaram resultados próximos aos obtidos nas mesmas condições com a utilização de GA_3 comercial, comprovando a eficácia do produto obtido.

Palavras-chave: GA_3 , FES, polpa cítrica, otimização, *F. moniliforme*, extrato, bromélias

ABSTRACT

Gibberellic acid (GA_3) is a natural hormone, acting as promoter and regulator of plant growth. It is industrially produced by submerged fermentation, but this process has become quite close to saturation with high production costs and hence higher sale value. Solid-State Fermentation (SSF) allows the use of agro-industrial residues reducing the production costs. The objective was to develop a process for the production and purification of GA_3 by SSF. To this end, we first considered the screening of strain (four of *Gibberella fujikuroi* and one of *Fusarium moniliforme*) as well as the best inoculum preparation and substrates (citric pulp, soy bran, sugarcane bagasse, soy husk, cassava bagasse and coffee husk). The fungus *Fusarium moniliforme* LPB 03 and citric pulp (CP) and the production of inoculum from extract of CP were chosen and the production in these conditions was 5.7 g of GA_3 /kg of dry CP. Were carried out optimizations of the physico-chemical process of GA_3 production in Erlenmeyer flasks with further study of the influence of aeration columns with forced aeration. The variables studied in Erlenmeyer flasks were temperature, initial moisture, particle size of substrate, inoculum rate and pH, addition of carbon or nitrogen source and magnesium salts ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), copper ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), potassium (KH_2PO_4) iron ($FeSO_4$) and zinc ($Zn_2SO_4 \cdot 7H_2O$). With the completion of this optimization we obtained an increase of 33.3 % in the production of GA_3 . Column for the fermentations with forced aeration were optimized variables moisture and aeration. After completion of the experimental design were obtained 0.053 g of GA_3 / kg of dry CP.h⁻¹ using Erlenmeyer flasks and 0.061 g of GA_3 / kg of dry CP.h⁻¹ after optimization in columns with forced aeration. The extract of the fermentation (EF) has been tested for cleansing and purification of GA_3 , which were tested silica C18, XAD16 resin and different types of activated carbon. The best results were obtained using a column containing activated carbon powder, 69.2% recovery of GA_3 after passing through the column. The EF was tested for its stability at room temperature and use as a source of GA_3 added to the growth medium of two species of bromeliad. EF appeared quite stable with less than 10% decrease in the amount of GA_3 after 110 days of storage. Biological tests with bromeliad showed results similar to those obtained under the same conditions with the use of GA_3 commercial, proving the effectiveness of the product.

Key-words: GA_3 , SSF, citric pulp, optimizing, *F. moniliforme*, extract, bromeliads

INTRODUÇÃO

Considerando a grande importância da agricultura para a economia do país, a procura de alternativas para o aumento da produção dos diversos produtos agrícolas é altamente justificada. Neste contexto, os hormônios vegetais têm sido utilizados para aumentar a eficiência técnica e econômica dos diversos sistemas de produção agrícola. Os hormônios vegetais conhecidos incluem as citocininas, giberelinas e auxinas. Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA_3) é um hormônio natural em plantas e importante promotor e regulador de seu crescimento. É produzido comercialmente apenas por grandes indústrias multinacionais por fermentação submersa, com altos custos de produção e valor de venda. Desta forma há um grande incentivo à procura de soluções para a sua produção.

A utilização do GA_3 em escala comercial é direcionada à agricultura, viveiros, viticultura, estufas de flores, micropropagação de plantas, entre outros. O GA_3 é utilizado a níveis de ppm e seu uso resulta em uma série de efeitos fisiológicos como: quebra da dormência de sementes, aumento da taxa de crescimento e divisão celular, melhora na produtividade e controle de safra, indução do florescimento, raleio de frutas, retardante da maturação.

Os resíduos de processos agrícolas, gerados em abundância no Brasil, causam graves problemas ambientais quando dispostos na natureza (Soccol, 1996a; Pandey et al., 2000b). A aplicação destes resíduos em diferentes processos fermentativos, além de estimular a utilização de diferentes substratos/suportes, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental (Soccol e Vandenberghe, 2003). Para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário utilizar matérias primas baratas e baixar os custos da produção, sem prejuízo à qualidade do produto final. O uso de resíduos em fermentação no estado sólido (FES) é economicamente importante, pois fornece uma alternativa biotecnológica para a valorização dos resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais.

A produção de GA_3 por FES vem sendo estudada utilizando diferentes estratégias como seleção de cepas, otimização das variáveis do processo e

batelada alimentada. Assim, altas produções de GA₃ por FES têm sido reportadas chegando a 5 g/kg de substrato (Corona *et al.*, 2005), dependendo da cepa, do substrato/suporte e da estratégia utilizada.

O presente trabalho envolveu o uso de subprodutos agrícolas e agroindustriais brasileiros como suportes/substratos para a produção do GA₃ por FES com quatro cepas de *Gibberella fujikuroi* e uma cepa de *Fusarium moniliforme*. A primeira etapa foi desenvolvida em frascos de Erlenmeyer e posteriormente em colunas com aeração forçada (escala laboratorial). Paralelamente aos estudos de produção do GA₃, foram estudadas a extração e purificação da biomolécula bem como a utilização do extrato de fermentação em bioensaios.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Desenvolver um bioprocesso para a produção, extração e purificação de ácido giberélico (GA_3) em diferentes modelos de biorreatores utilizando o fungo *Gibberella fujikuroi* e/ou *Fusarium moniliforme*, em FES, empregando-se resíduos agrícolas e agroindustriais brasileiros.

Objetivos específicos

1. Testar e selecionar cepas do gênero *Gibberella* e *Fusarium* de bancos de cepas internacionais para a produção de ácido giberélico (GA_3);
2. Caracterizar os substratos/suportes a serem utilizados no processo através de análises físico-químicas;
3. Desenvolver um bioprocesso para a produção de GA_3 em escala laboratorial por FES usando resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais;
4. Otimizar a produção de GA_3 através do estudo da influência de fatores químicos e físicos sobre o processo em escala laboratorial;
5. Acompanhar o metabolismo dos microrganismos (análise respirométrica) selecionados através do seu comportamento em estudo da cinética da produção do GA_3 por FES, nas condições otimizadas (frascos de Erlenmeyers e colunas de vidro com aeração forçada), com o(s) suporte(s)/substrato(s) selecionados;
6. Extrair, analisar e purificar o metabolito produzido utilizando diferentes metodologias;
7. Determinar a estabilidade do extrato fermentado obtido e sua eficiência através de ensaios biológicos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. AS GIBERELINAS

As giberelinas (GA_s) constituem uma grande família de ácidos dipentenóides estreitamente relacionados, representando um grupo importante de fitormônios que exercem diversos efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas, tais como germinação, expansão das folhas, desenvolvimento das flores e, assim como as auxinas, estimulam a atividade de transferência do sistema vascular, causando maior formação de xilema e floema em plantas lenhosas (Buchanan *et al.*, 2000; Tucker e Roberts, 2000; Davies, 2004). Tais propriedades tornaram as giberelinas uma ferramenta valiosa na agricultura (Brückner e Blechschmidt, 1991; Croker, 2000; Shukla, 2005).

Mais de 120 GAs já foram isoladas quer de plantas gimnospermas, angiospermas e pteridófitas, produzidas por microrganismos como fungos e bactérias ou então obtidas por via sintética (Jefferys, 1970; Blake *et al.*, 2000; Hedden e Phillips, 2000).

São denominadas genericamente GA_n , onde n representa aproximadamente a ordem cronológica em que foram descobertas (Hill, 1977; Arteca, 1995). A maioria delas, entretanto, são precursores de menor importância ou formas biologicamente inativas. As que sem dúvida apresentam a maior relevância são as GA_1/GA_3 e GA_4/GA_7 , cujos efeitos biológicos acentuados, as tornam comercialmente importantes.

A produção industrial de GAs é realizada através de fermentação submersa do fungo ascomiceto *Gibberella fujikuroi*. Mas, embora a química, biossíntese, modo de ação, relação entre estrutura e atividade e utilização das GAs já tenham sido extensivamente investigadas (Brückner e Blechschmidt, 1991; Hollmann *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995), sabe-se pouco sobre a produção de GAs por fermentação (Gelmi *et al.*, 2000).

1.1 Histórico

Os primeiros relatos sobre as giberelinas dizem respeito a estudos de cientistas japoneses sobre uma doença que afetava particularmente o arroz, chamada de “bakanae” ou “doença da plantinha boba”, pelos fazendeiros locais (Hori, 1903). Esta é uma das mais antigas enfermidades que afetam o arroz no oriente, especialmente no Japão. As plantas doentes tornam-se mais delgadas e longas e com uma cor amarelada nas partes afetadas. Após um crescimento muito rápido, as plantas infectadas morrem. Hori demonstrou que os sintomas eram induzidos pela infecção de um fungo do gênero *Fusarium* provavelmente *Fusarium heterosporium* Ness. (Takahashi, 1986).

Até 1930 a classificação do fungo responsável pela doença não estava ainda definida, quando a partir desta data o seu estado imperfeito, produtor de esporos, foi denominado de *Fusarium moniliforme*, e seu estado perfeito, não produtor de esporos, denominado de *Gibberella fujikuroi*.

Com o início da Segunda Guerra Mundial a investigação a respeito das giberelinas foi interrompida no Japão. Após a guerra iniciou-se uma nova fase, onde as pesquisas sobre a doença chamaram atenção do ocidente, em especial Estados Unidos e Grã-Bretanha (Takahashi, 1986; Metivier, 1979).

As giberelinas começaram a ser aplicadas na agricultura no início dos anos 50. Inicialmente, fermentações em escala de laboratório com *G. fujikuroi* foram conduzidas pela *Imperial Chemical Industry* (ICI), provendo pequenas quantidades para cientistas ao redor do mundo. O interesse pela produção de giberelinas aumentou consideravelmente, e laboratórios como Abbott, Merck, Eli Lilly e Pfizer nos Estados Unidos e *Takeda Chemical Industries* no Japão, tiveram licença de fabricação do produto, consentida pela ICI (Takahashi, 1986).

A partir dos anos 60 foi realizada uma série de estudos das GAs sobre vários vegetais, cobaias e microrganismos resultando em muitas conclusões não confirmadas onde uma série de benefícios foi reportada (Mees e Elson, 1978). Ao mesmo tempo apareceram os primeiros estudos para a sua síntese em laboratório (Kios e Loewenthal, 1963). Desde então, várias técnicas de produção têm sido

utilizadas e estudadas na tentativa de tornar os processos cada vez mais reprodutíveis e economicamente viáveis.

1.2. Propriedades Químicas das Giberelinas

Todas as GAs possuem um esqueleto ent-giberelano e são divididas em dois grupos, dependendo ou não da existência do carbono 20. As GAs – classe A (Figura 1) – de 19 átomos possuem uma ponte 19-10 γ -lactônica, à exceção da GA_{11} que apresenta ponte carbono 19-2. No caso das GA_s com 20 átomos – classe B, o carbono 20 pode estar na forma de CH_3 , CH_2OH , CHO ou $COOH$ (Hanson, 1967) e formando uma ponte 19-20 δ -lactônica.

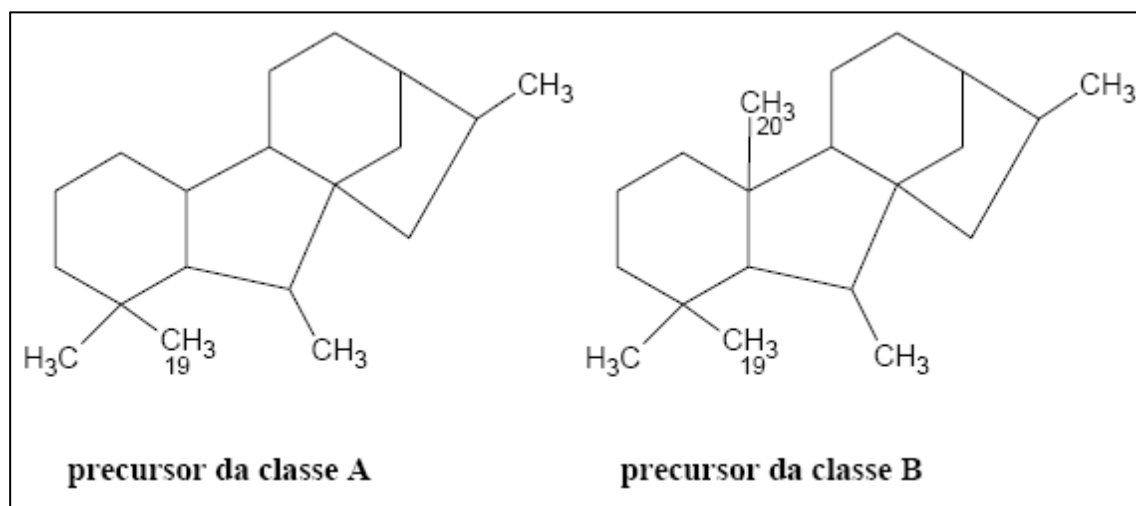


Figura 1- Estrutura do ent-giberelano (que dá origem à classe A das giberelinas) e do 20-nor ent-giberelano (que dá origem à classe B das giberelinas)

Entretanto, a estrutura básica de todas as giberelinas e a numeração é similar (Kumar e Lonsane, 1989), como mostrado na Figura 2.

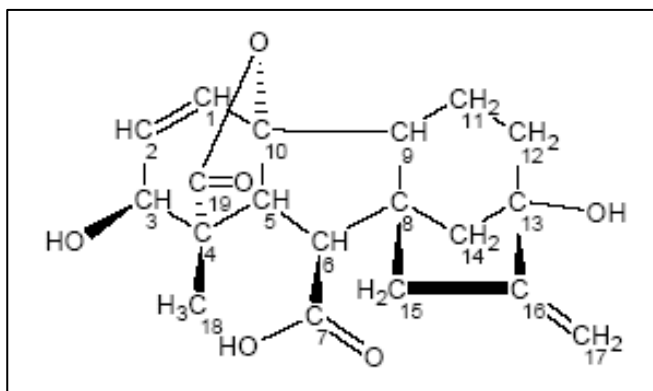


Figura 2 - Estrutura base das giberelinas e a numeração de seus átomos de carbono

Além do número de carbonos, as giberelinas diferem quanto ao número e posição dos grupos hidroxila, quanto ao estado de oxidação do C₂₀ e com a presença ou ausência da ponte de lactona entre C₁₀ e C₁₉. Grande parte destas giberelinas são precursores ou metabólicos inativos derivados de giberelinas ativas como o GA₁ que é a principal giberelina responsável pelo alongamento dos caules de plantas.

A quantificação das GAs normalmente é difícil, pois as GAs possuem baixa absorção no ultravioleta (UV), não apresentam fluorescência, e não apresentam boa distinção entre suas características químicas (Figura 3) o que seria a base de ensaios químicos específicos. (Taiz e Zeiger, 1998; Tucker e Roberts, 2000).

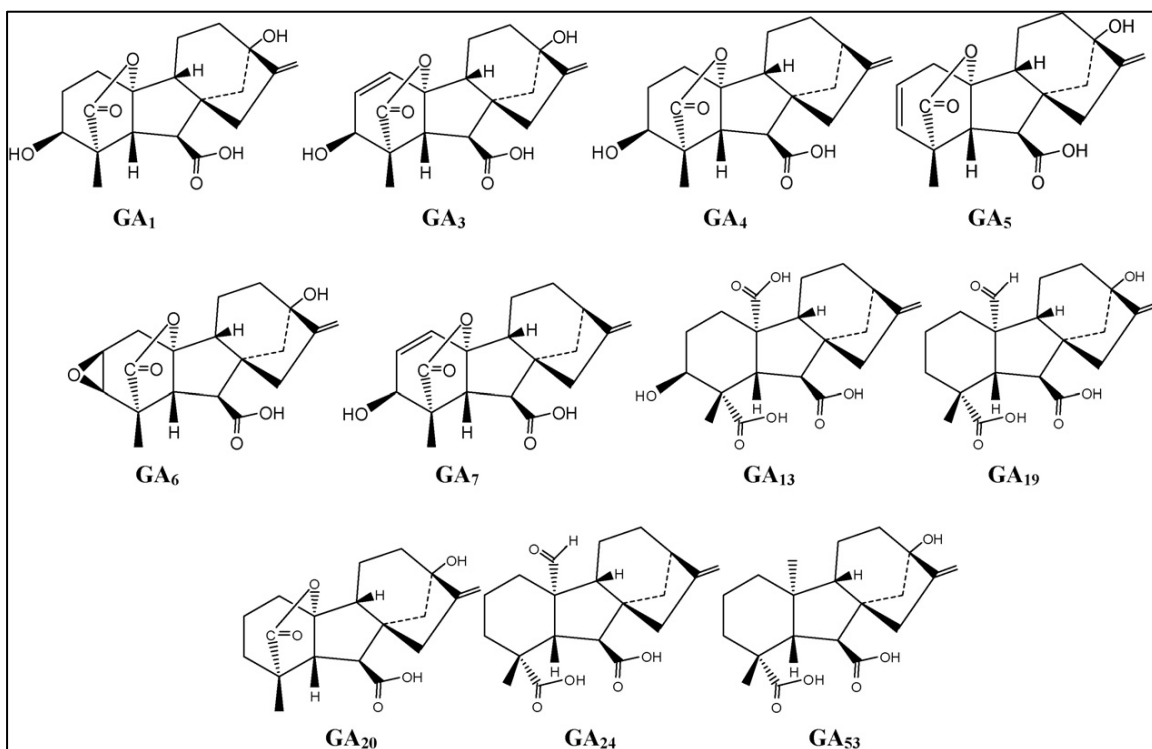


Figura 3 - Estrutura química de algumas giberelinas

Fonte: Ge *et al.*, 2007

1.3 Biossíntese das giberelinas

A via de formação das GAs inicia-se a partir da acetil-coenzima A formada a partir da via glicolítica. Ao invés de serem aproveitadas no ciclo de Krebs, duas moléculas deste metabólito sofrem uma condensação catalisada pela tiolase resultando na acetoacetil-CoA, que por sua vez condensa-se com outra acetil-CoA para resultar o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA. Uma redução deste último pela nicotinamida-adenosina-dinucleotídeo-fosfato dá origem ao mevalonato (Figura 4).

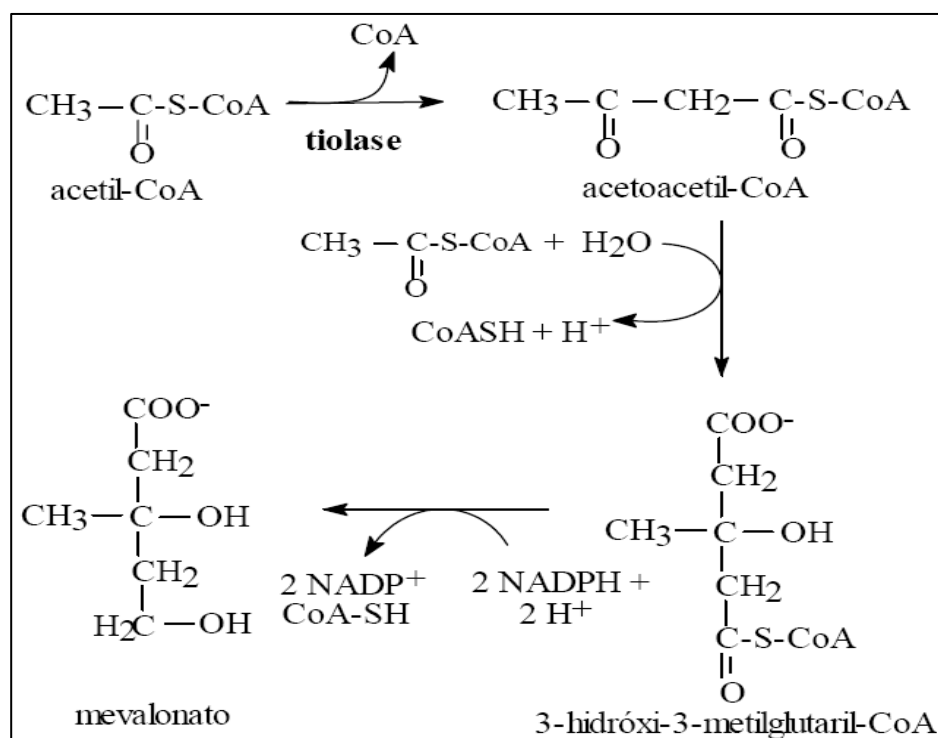


Figura 4 - Via de formação do mevalonato a partir da acetil- CoA

Fonte: Hedden *et al.*, 1978

O mevalonato formado sofre rearranjo para dar como resultado os pontos-chaves da via, o pirofosfato de isopentenila e o pirofosfato de γ,γ -trimetilalila, compostos identificados com a unidade isopreno, bloco formador dos compostos terpenóides, e que acabam por se unir em quatro unidades, formando os diterpenos.

Uma vez formadas as unidades identificadas com o isopreno - o pirofosfato de isopentenila e, posteriormente, o pirofosfato de γ,γ -dimetilalila, temos a primeira condensação das unidades isoprênicas para formar o pirofosfato de geranila (Figura 5). Outra condensação formará o pirofosfato de farnesila e ainda outra, subsequêntemente, o pirofosfato de geranil-geranila, mediada pela geranil-geranil sintase 2 (ggs2). O pirofosfato de geranil-geranila sofrerá ciclização pela copalil sintase, resultando o pirofosfato de copalila. Este último dará origem ao ent-caureno pela ação da ent-caureno sintase.

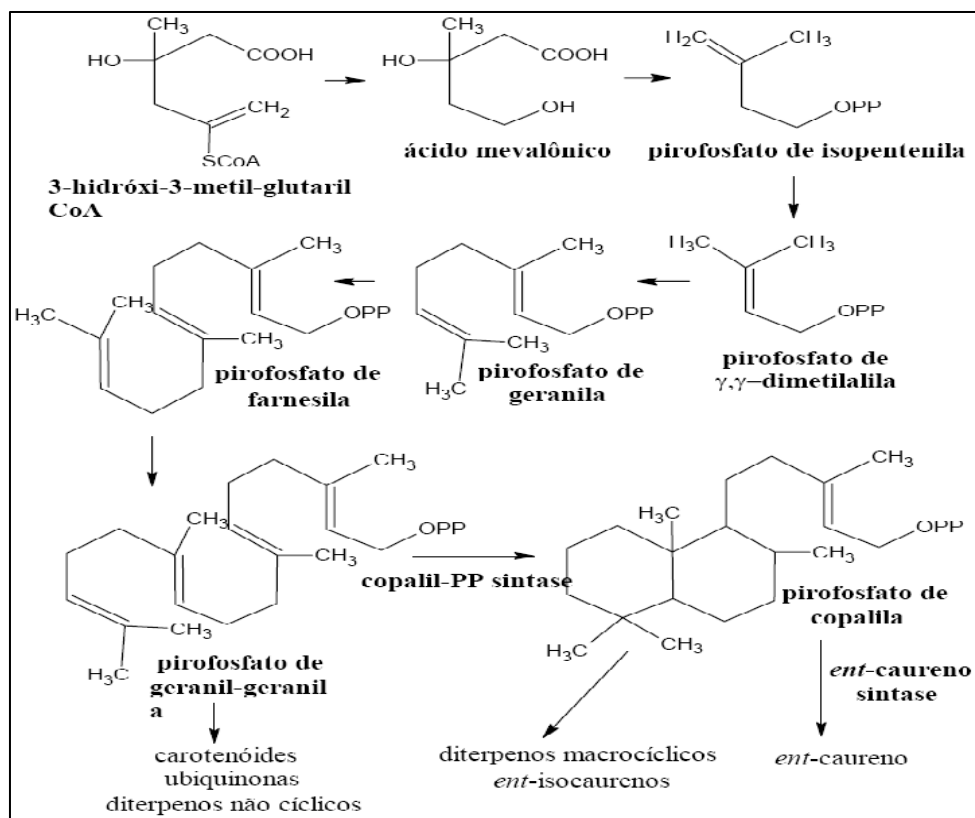


Figura 5 – Via bioquímica da condensação das unidades isoprênicas e formação do *ent*-caureno

Fonte: Hedden, 1978

Uma vez formado o ent-caureno, a via passa por compostos que sofrem modificações sucessivas nos grupos ligados ao anel gibano (que não sofre qualquer modificação), e sempre catalisadas pelas citocromo P-450 oxigenases, até formar o GA₁₂-aldeído (Figura 6).

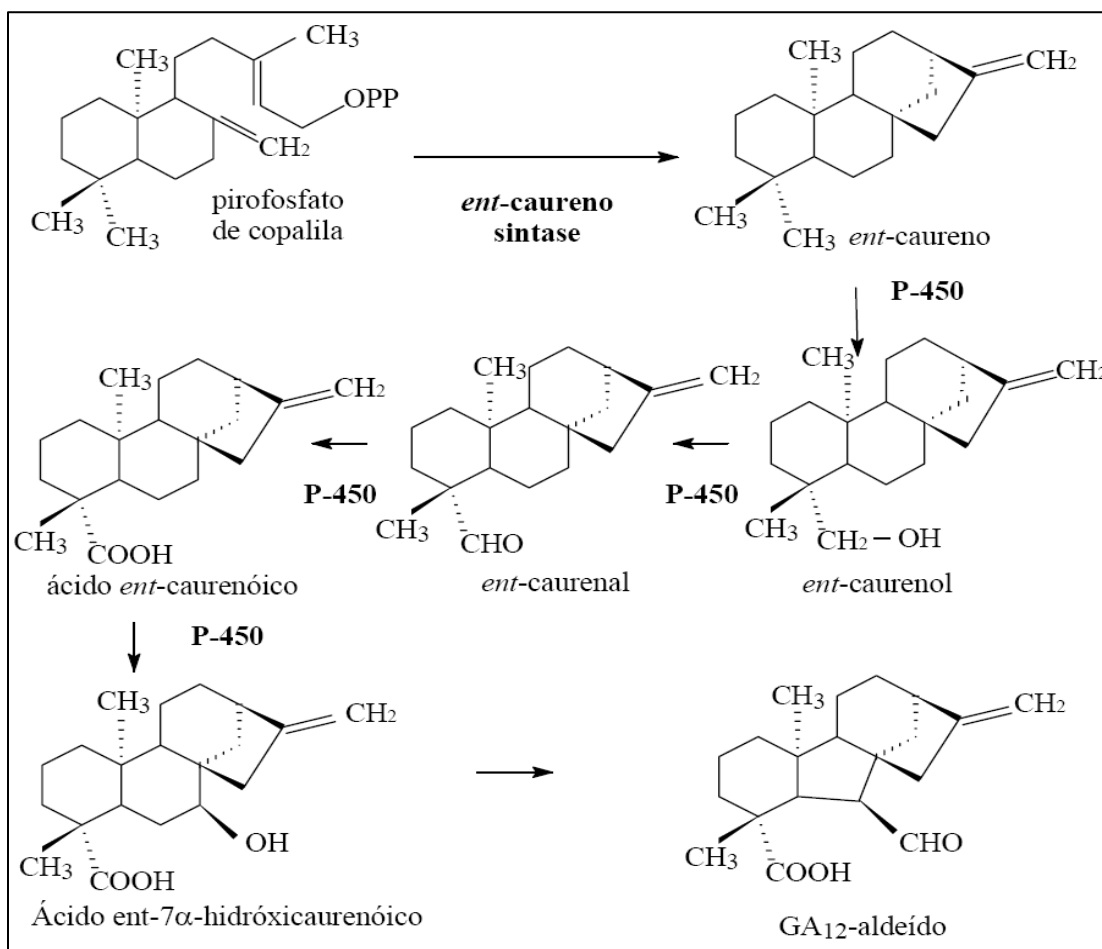


Figura 6 - Via de formação do GA₁₂-aldeído

Fonte: Hedden, 1978

Esta via biossintética é comum a muitas moléculas biológicas, incluindo o ácido abscísico (15 C), os carotenóides e esteróides. A primeira reação exclusiva da via de biossíntese de giberelinas é a ciclização do geranyl geranyl pirofosfato para formar o caureno. Esta molécula sofre sucessivas oxidações até formar a primeira giberelina que é o aldeído GA₁₂ que pode seguir por duas vias diferentes

(3- β hidroxilação ou não 3- β hidroxilação) e formar as outras giberelinas (Figura 7).

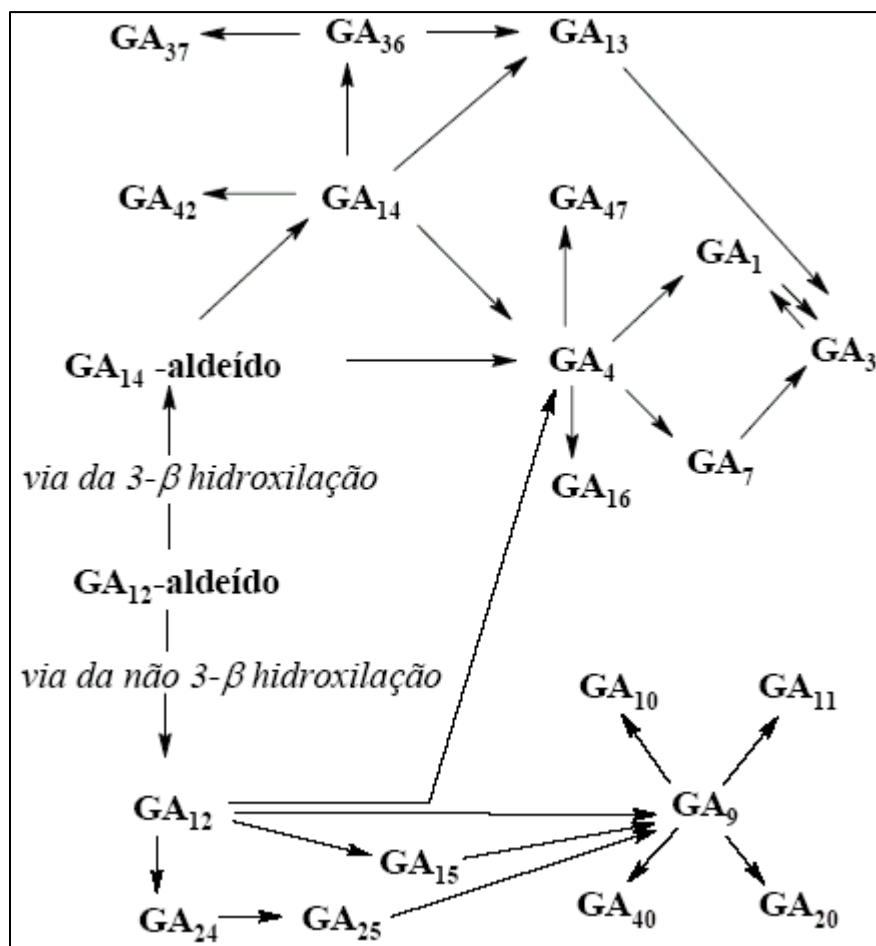


Figura 7 – Rotas metabólicas para formação de giberelinas

Fonte: Hedden *et al.*, 1978

Um dos mecanismos conhecidos de conversão, entre formas ativas e inativas e vice-versa, é a adição ou remoção de grupos hidroxila de posições específicas dos anéis das giberelinas. Com a ajuda de mutantes deficientes no processo de biossíntese, foi possível traçar a via biossintética do aldeído GA₁₂ até GA₁. A hidroxilação do GA₂₀ na posição 3b origina o GA₁ enquanto que a adição de uma nova hidroxila à molécula do GA₁ na posição 2b resulta na formação da GA₈ que é inativa biologicamente.

1.3.1 Aspectos Genéticos

A genética da biossíntese das giberelinas está bem desenvolvida, devido especialmente aos avanços da engenharia genética, principalmente na clonagem de genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese de GAs, como a *ent*-copalil sintase, a caureno sintase e várias citocromo P450 monooxigenases.

Um passo importante no trabalho genético na *G. fujikuroi* foi a identificação do gene responsável pela enzima nitrato redutase (*nidD*), que serviria mais tarde como um marcador de seleção, baseado na habilidade do microrganismo que o incorpora de crescer em meio apenas com nitrato como fonte de nitrogênio. Baseado nesta capacidade seletiva desenvolveu-se uma livreria de cosmídeos que fornece uma frequência de mais de 200 transformações.g⁻¹ de DNA (Tudzynski, 1999).

Desde que a síntese das giberelinas segue a rota dos isoprenóides, eles servem de substrato do ponto de ramificação das enzimas fitoeno-sintase (para rota dos carotenóides) e *ent*-CDP sintase (para rota das giberelinas).

Da rota dos isoprenóides três genes foram isolados. Os que codificam a 4-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (Woitek *et al.*, 1997) e a FDP sintase (Homann *et al.*, 1996), foram clonados por PCR com base na sequência hibridizante comum de genes de fungos e de vegetais superiores. O gene para a GGDP sintase (*ggs*) da *G. fujikuroi* (Mende *et al.*, 1997) foi isolado por hibridização heteróloga usando o gene correspondente da *Neurospora crassa*, o *al-3* como sonda (Nelson *et al.*, 1989), pois a sequência peptídica entre os dois genes mostra grande similaridade. Ao contrário do gene da *N. crassa*, entretanto, o da *G. fujikuroi* não sofre regulação pela luz azul (Mende *et al.*, 1997). Todos estes genes, codificando para a HMG-CoA redutase, a FDP sintase e a GGDP sintase, possuem apenas uma cópia e são genes constitutivos, onde grandes quantidades de amônia e de glucose não afetam a sua transcrição.

Também foi estudado a clonagem dos genes reguladores de síntese após a formação do GGDP. A técnica usada foi o *screening* diferencial de livreria de cDNA obtido a partir de uma cepa selvagem de *G. fujikuroi* m567, sob condições

indutoras de formação de GAs. Esta livraria foi obtida de RNA poliadenílico de micélio extremamente jovem, ainda em fase de crescimento, e RNA poliadenílico derivado de micélio em fase de produção de GAs.

Entre 55 clones obtidos a partir de genes induzidos pela fase de crescimento um deles, pretensamente codificando o citocromo P450 monooxigenase foi encontrado (Tudzynski e Höltter, 1998). Uma vez que vários passos da fase biossintética das GAs são catalisados por P450 monooxigenase. Descobriu-se que ele possuía uma cópia com elevado grau de homologia, principalmente na região que se liga ao grupamento heme, o que deu origem à denominação P450-1 e P450-2.

Tudzynski e Höltter (1998) encontram abaixo da sequência do P450-2, um segundo gene da *G. fujikuroi* para a GGDP sintase (hoje denominado ggs2). Ele guarda 60% de similaridade com o gene albino-3 da *N. crassa* (Nelson, 1989) e com o então recém isolado gene ggs (denominado ggs1) da *G. fujikuroi* (Mende *et al.*, 1997).

Imediatamente seguindo o ggs2, aparece o gene para a *ent*-copalil sintase (cps/ks). Este gene foi clonado usando-se a técnica de PCR. Qualquer ruptura deste gene redundaria na total inabilidade de síntese de giberelinas, indicando que não possui cópias ou homólogos (Tudzynski *et al.*, 1998).

Em *G. fujikuroi*, sua bifuncionalidade foi deduzida por comparação com o gene cps/ks de *Phaeosphaeria* sp. L487, a primeira a ser reconhecida (Kawaide *et al.*, 1997).

1.4 Interações das Giberelinas

1.4.1 Com Plantas

Tecidos de plantas geralmente contêm apenas cerca de 0,001 a 1,0 mg de GAs por kg de peso fresco. Giberelinas diferentes podem ser usualmente encontradas na mesma planta e a proporção entre elas pode mudar dependendo do estágio de desenvolvimento. A maioria das plantas contém uma mistura de

diversas giberelinas que apresentam diferenças quanto à atividade biológica. Muitas das giberelinas isoladas são provavelmente intermediários de biossíntese ou formas inativas.

Os efeitos causados pelas giberelinas dependem do gênero, órgãos e estágio de desenvolvimento da planta. Dentro do sistema hormonal das plantas, as giberelinas interagem com outros hormônios reguladores de crescimento como auxinas, citocininas e ácido abscísico (Takahashi, 1986; Brückner e Blechschmidt, 1991).

As folhas jovens são sítios importantes de síntese de giberelinas, como ocorre com as auxinas. Sementes imaturas e raízes também são locais de síntese deste fitormônio. Remoções sistemáticas de parte do sistema radicular acarretam um decréscimo acentuado na concentração de giberelinas das partes aéreas, sugerindo que uma parcela significativa das giberelinas destes órgãos é suprida pelas raízes.

As giberelinas são livremente transportadas através do xilema e do floema. As folhas jovens transportam giberelinas para o caule via floema, mas ainda não se sabe ao certo como isso acontece.

1.4.2 Com o microrganismo produtor, algas e animais

O fungo *G. fujikuroi* produz grandes quantidades de GA₃ e algumas outras giberelinas como metabólitos secundários, se comparado com a quantidade existente em plantas superiores. Cientistas japoneses encontraram estímulo na germinação de esporos e alongamento das hifas pela ação do GA₃, afirmando, desta forma, que a função deste metabólito é a mesma nos fungos que nas plantas (Brückner e Blechschmidt, 1991).

Em algas foram reportados compostos semelhantes às GAs e que possuem atividade biológica nestes mesmos vegetais, como a *Hypnea musciformis*, a *Enteromorpha prolifera*, a *Ecklonia sp.* e outras (Jennings e McComb, 1967 e Jennings, 1968). Extratos destas algas, bem como o próprio GA₃, comprovadamente estimularam o crescimento da *E. prolifera*. Dados obtidos da

Ecklonia radiata, apontaram GAs endógenos como reguladores do crescimento destas algas (Jennings, 1971).

2. O ÁCIDO GIBERÉLICO

Das mais de 120 GAs isoladas, o ácido giberélico (GA₃) tem recebido maior atenção devido a sua extensiva utilização principalmente na agricultura (Brückner e Blechschmidt, 1991; Croker, 2000).

2.1. Propriedades Físicas, Químicas e Biológicas do GA₃

O ácido giberélico (C₁₉H₂₂O₆) é um sólido cristalino, pouco solúvel em água (5 g/L) e facilmente solubilizado em solventes orgânicos como metanol, etanol, acetato de etila, acetato de butila e acetona. É estável quando seco, mas instável em soluções aquosas. A meia vida em soluções aquosas diluídas é da ordem de 14 dias a 20°C e 2 horas a 50°C. Em soluções aquosas o GA₃ tem pH de 3 a 4 (Merck Index, 1983; Brückner e Blechschmidt, 1991).

É quimicamente caracterizado como um ácido tetracíclico dihidroxi-γ-lactônico contendo duas ligações duplas C-C e uma carboxila livre (Figura 8). Sua estrutura foi obtida pelo estudo da decomposição de produtos ácidos e sua estereoquímica absoluta foi deduzida de dispersão rotatória, dicroísmo circular e análises de raio-X. Ele produz uma coloração azul intensa e forte fluorescência azulada após reação com ácido sulfúrico (Kumar e Lonsane, 1989).

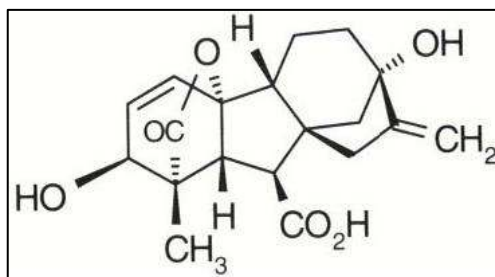


Figura 8 - Estrutura molecular do ácido giberélico

Fonte: ANVISA, 2007

2.2 Utilização comercial e potencial do GA₃

O uso corrente de GA₃ em escala comercial é voltado à agricultura, viveiros, vivicultura, estufas de flores, entre outros. O GA₃ é utilizado em níveis de ppm e seu uso resulta em uma série de efeitos fisiológicos. Algumas de suas aplicações são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Aplicações do GA₃

Aplicação	Ação/Benefício	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Aumento da produção de alfa-amilase	Takahashi, 1986
Cana-de-açúcar	Melhora na produtividade	Kumar e Lonsane, 1989
Infecção das folhas de batatas por <i>P.infestans</i>	Inibição dos esporangiosporos do parasita	Kumar e Lonsane, 1989
Conservação pós-colheita de lima ácida “Tahiti”	Manutenção da cor verde da casca	Biasi e Zanette, 2000
Frutos de lima ácida “Tahiti”	Efeito sobre a floração e fixação dos frutos	Serciloto e Castro, 2001
Efeito sobre o florescimento de crisântemo	Antecipação do florescimento	Schmidt <i>et al.</i> , 2003
Uvas do cultivar Niagara Rosada	Aumento da massa e do número de bagos, diminuição do número de sementes	Botelho <i>et al.</i> , 2003
Maturação de caqui “Fuyiu”	Retardamento da maturação	Ferri <i>et al.</i> , 2004
<i>Passiflora nitida</i> Khunt	Efeito sobre a germinação – quebra de dormência	Passos <i>et al.</i> , 2004
Frutos de lichia “Yu Her Pau”	Aumento da massa da fruta	Chang e Lin, 2006
Cultivo da batata	Promoção da multiplicação e alongamento celular, quebra da dormência	Alexopoulos <i>et al.</i> , 2007

Sementes de <i>Trichocereus terscheckii</i>	Promoção da germinação com e sem luz	Ortega-Baes e Rojas-Aréchiga, 2007
Sistemas de tecidos de ratos	Promoção da peroxidação de lipídeos e altera os sistemas antioxidativos	Celik <i>et al.</i> , 2007
Pêssegos e nectarina	Inibição da floração	Gozalez-Rossia <i>et al.</i> , 2007
Sementes de ervilha	Estímulo do crescimento dos brotos	Baumgartnert <i>et al.</i> , 2008
Efeito na polinização de tangerina Clementine para obtenção de frutos sem sementes	Prejudica a fertilização por ter ação na ovulação e na polinização sob condições de polinização cruzada	Mesejo <i>et al.</i> , 2008
Influência nos parâmetros vegetativos de morangos 'Chandler'	Altura e espalhamento da planta, comprimento do petilo, número de folhas e área das folhas	Sharma e Singh, 2009

3. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO GA₃

A fermentação é o método industrial aplicado para a obtenção de GA₃. Existe a possibilidade de produzi-lo também por síntese química ou por extração de plantas. Estes métodos, porém, só possuem interesse acadêmico, devido ao baixo rendimento e conseqüente alto custo.

O processo de fermentação submersa comumente utilizado na produção de GA₃ apresenta diversas vantagens, tais como facilidade operacional, economia, reduzido espaço, e controle preciso de parâmetros operacionais (Kumar e Lonsane, 1989, Jefferys, 1970). Porém, apesar do uso da melhor tecnologia de processo, a produção de GA₃ é baixa. Já em 1979, demonstrou-se que o processo de fermentação submersa estava muito próximo da saturação, ponto em que a redução do custo tornar-se-ia impossível. A presença do produto em forma diluída no meio é reconhecida como o maior obstáculo, principalmente devido aos elevados custos no processo de lavagem e na disposição das águas. Além disso, o custo da separação das células por centrifugação ou microfiltração envolve entre

48 e 76% do custo total de produção do metabólito por FSm (Kumar e Lonsane, 1989).

Diferentes estudos têm sido realizados na tentativa de diminuir os custos de produção do GA₃, usando diversas técnicas tais como seleção e manipulação genética dos microrganismos, otimização das condições de cultura e de nutrientes, desenvolvimento de novos processos fermentativos (como fermentação no estado sólido – FES), minimização do custo de extração e utilização de substratos mais baratos tais como resíduos industriais (Tabela 2).

Tabela 2 - Diferentes estratégias de produção de GA₃ por FES utilizando resíduos e/ou subprodutos

Substrato/ Suporte	Estratégia usada	Produção	Referência
Resíduo do processamento do mexilhão (MPW)/ Sabugo de milho	Produção em batelada alimentada	3,8 g/Kg	Pastrana <i>et al.</i> , 1995
Farelo de trigo	Produção em batelada alimentada	3 g/Kg	Bandelier <i>et al.</i> , 1997
Bagaço de mandioca	Otimização de condições química e físicas	250 mg/kg	Tomasini <i>et al.</i> , 1997
Glucose e Farinha de arroz	-	2,862 g/L	Escamilla <i>et al.</i> , 2000
Meio sintético	Suporte inerte	0,73 mg/g de suporte	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
Casca de café	Seleção de cepas	100 mg/kg	Machado <i>et al.</i> , 2001
Casca de café e bagaço de mandioca	Otimização das condições químicas e físicas	492,5 mg/kg	Machado <i>et al.</i> , 2002
Meio sintético	Modelagem do crescimento da cepa e produção do GA ₃	-	Gelmi <i>et al.</i> , 2002
Glucose e Farinha de arroz	-	1 g/L	Shukla <i>et al.</i> , 2005

Farelo de trigo e amido solúvel	Otimização das condições químicas e físicas	4,5-5 g/kg de massa seca	Corona <i>et al.</i> , 2005
Bagaço de mandioca e casca de arroz	Estudo de substrato, pH, temperatura e umidade do processo	1,58 mg/g de substrato seco	Otálvaro <i>et al.</i> , 2008

3.1 Fermentação no Estado Sólido (FES)

A FES é caracterizada pelo desenvolvimento do microrganismo em um ambiente com ausência de água livre, sobre e no interior de partículas porosas úmidas denominadas suporte ou matriz sólida. Esta matriz sólida não solúvel atua tanto como suporte físico quanto como fonte de nutrientes. Não é necessário combinar as funções substrato e suporte, mas é fundamental a reprodução das condições de alta atividade de água e alta transferência de oxigênio que podem ser obtidas usando um material inerte impregnado com uma solução nutritiva (Soccol, 1996b; Vandenberghe *et al.*, 2000a; Soccol e Vandenberghe, 2003).

Vários autores apresentam as vantagens e desvantagens da FES (Soccol, 1994; Soccol e Vandenberghe, 2003). Podem ser citadas algumas vantagens como: condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais; simplicidade no preparo do meio de cultura; diminuição de contaminações; redução dos efluentes líquidos a tratar; resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação; produção concentrada de metabólitos e a eliminação da formação de espuma.

Por outro lado, as limitações da técnica ainda impedem sua ampla utilização industrial como: dificuldade de remoção de calor, tipos de substratos limitados e a dificuldade de se medir variáveis como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido. As diferenças básicas entre a fermentação submersa e no estado-sólido estão apresentadas a seguir na Tabela 3:

Tabela 3 - Comparação entre FES e Fermentação Submersa

<i>Fermentação no Estado Sólido</i>	<i>Fermentação Submersa</i>
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Altura do meio limitado	Altura do meio variável com o biorreator
Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes	Consumo limitado de água, baixa a_w , sem efluentes.
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato	Aeração requer elevado fluxo.
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Condições estáticas	Boa homogeneização
Equipamentos Industriais disponíveis	Necessita projetos
Inoculação de esporos, batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por bactérias do ácido láctico
Baixo consumo de energia	Elevado consumo energético
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico.

Fonte: Holker e Lenz 2004; Raimbault, 1997.

Diversos tipos de fermentadores têm sido utilizados para FES em modelo de batelada ou até em contínuo. Uma característica comum em quase todos esses modelos tem sido sua simplicidade no funcionamento. Estudos laboratoriais geralmente são conduzidos em frascos (reatores de vidro), bequers, placas de Petri, jarros e colunas de vidro. Frascos de Erlenmeyer com abertura larga oferecem facilidade na manipulação e têm sido comumente empregados para processos de FES sem qualquer agitação e aeração.(Soccol e Vandenberghe, 2003).

3.1.1 Substratos

O Brasil possui uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, por sua produção de café, cana-de-açúcar, soja, frutas, entre outros. Praticamente todo produto é exportado, tornando este fato uma definitiva contribuição para o desenvolvimento econômico (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Os resíduos de processos agrícolas, gerados em abundância no Brasil, causam graves problemas ambientais quando dispostos na natureza (Soccol, 1996a; Pandey *et al.*, 2000b). O reaproveitamento destes resíduos como substrato/suporte, além de ser uma alternativa em processos fermentativos, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Diversos resíduos e subprodutos da agroindústria têm sido estudados como substrato/suporte em FES. Alguns destes resíduos são descritos a seguir.

Bagaço de mandioca

O Brasil é o segundo maior produtor de mandioca, com 23 milhões de toneladas, atrás apenas da Nigéria, que produz 34 milhões de toneladas (Brasil, 2009). A quantidade de resíduos gerados na industrialização da mandioca depende do método de processamento adotado.

O processo de industrialização da mandioca causa sérios problemas ambientais em função de sua disposição na natureza. Até mesmo as fábricas de pequeno porte produzem quantidades significativas de resíduos. O bagaço de mandioca é composto pelo material fibroso da raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento (Cereda, 1994). No processamento de 250-300 t de raízes de mandioca para a obtenção da fécula são gerados 1,16 t de películas e cerca de 280 t de bagaço de mandioca com umidade de 85%. Estes resíduos sólidos geralmente são descartados no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento (Pandey *et al.*, 2000b).

Segundo Lima *et al.* (2008), o bagaço de mandioca apresenta em sua composição: 87,5% de matéria seca, 1,95% de proteína bruta, 0,6% de extrato etéreo, 1,62% de matéria mineral, 18,75% de fibras e 97,10% de carboidratos totais.

Bagaço de cana

O bagaço de cana, resíduo fibroso obtido após a extração do caldo de cana do caule da cana-de-açúcar, é um subproduto celulósico da indústria do açúcar gerado em grande quantidade, sendo utilizado como combustível das caldeiras (Soccol e Vandenberghe, 2003). A quantidade gerada deste resíduo tem aumentado cada vez mais devido ao incentivo na produção de etanol, o que leva a um aumento significativo na deposição no ambiente de bagaço de cana não aproveitado nas usinas.

As fibras do bagaço da cana contêm, como principais componentes, cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina, sendo este último responsável pelo seu baixo aproveitamento na alimentação animal (Teixeira *et al.*, 2007).

Além deste fato, há vantagens em se utilizar o bagaço como um substrato para a bioconversão já que possui alto conteúdo de carboidratos, é coletado no local do processamento, é um substrato barato e há um constante suprimento da cana-de-açúcar (Pandey *et al.*, 2000).

O bagaço de cana já foi utilizado em vários processos para obtenção enzimas, ácidos orgânicos, cogumelos, no enriquecimento protéico de ração animal e produção de bioetanol (Pandey *et al.*, 2000a; Soccol e Vandenberghe, 2003; Soccol *et al.*, 2010).

Casca de café

O café é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. No período compreendido entre Novembro/2008 e Outubro/2009 a ABIC registrou o consumo

interno de 18,39 milhões de sacas de café, isto representando um acréscimo de 4,15% em relação ao período anterior correspondente (Nov/07 a Out/08), que havia sido de 17,65 milhões de sacas. A exportação ficou em torno de 2 milhões de sacas em Janeiro de 2009 (ABIC, 2010). A casca de café é o principal subproduto no processo do café por via seca, representando cerca de 50% em massa do mesmo, chegando a uma produção anual superior a um milhão de toneladas no Brasil. Esse resíduo praticamente não é aproveitado, sendo deixado em pilhas perto das fazendas e causando um grande problema ambiental.

Apesar de seu potencial poluente e de sua riqueza nutricional (composição próxima à do grão), existem poucos trabalhos na sua caracterização e possível utilização como matéria prima para a indústria. A maioria dos trabalhos existentes foi realizada por pesquisadores de países da América Latina como México, Cuba, Guatemala e tratam do aproveitamento da polpa, uma vez que este é o principal resíduo gerado no processamento por via úmida, feito por esses países. A casca do café é formada pela polpa (epicárpio + mesocárpio) e o pergaminho (endocárpio), a primeira representando cerca de 75%. Dessa forma, a composição química (Tabela 4) e as possíveis utilizações são semelhantes.

Tabela 4 - Composição química média da casca de café

<i>PROPRIEDADES</i>	<i>VALOR (%)</i>
Proteína bruta	10,20
Fibra em detergente neutro	73,15
Fibra em detergente ácido	51,16
Celulose + Hemicelulose	39,21
Extrato etéreo	1,37

Fonte: Júnior *et al.*, 2007

Farelo de Polpa Cítrica

O farelo de polpa cítrica (PC) é um resíduo da agroindústria brasileira cuja exportação anual gira em torno de um milhão de toneladas por ano. É usada como

complemento para a ração animal, principalmente na pecuária, sendo obtida por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco de frutas cítricas. Entre esses resíduos estão cascas, sementes e polpas de laranjas. Este material equivale a 50% do peso de cada fruta e tem uma umidade de aproximadamente 82%. Após passar pelo processo de industrialização onde a polpa é triturada e seca até chegar a 12% de umidade, o produto é peletizado (Abecitrus, 2006). A composição do farelo de polpa cítrica é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades do farelo de polpa cítrica

<i>PROPRIEDADES</i>	<i>VALOR</i>
Matéria seca	88 - 89%
Proteína Bruta (mínimo)	6 - 8%
Extrato Etéreo (mínimo)	3 - 4%
Matéria Mineral (máximo)	7 - 8%

Fonte: União Farelos, 2010.

Farelo de soja

O farelo de soja é obtido a partir da moagem dos grãos de soja, para extração do óleo, que é destinado para consumo humano. É um dos ingredientes de maior importância utilizado em rações animais, rico em proteínas, tiamina, colina e niacina (União Farelos, 2010). A composição do farelo de soja é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição do farelo de soja

PROPRIEDADES	VALOR
Umidade	12,5%
Proteína	48,0%
Gordura	2,00%
Fibras	3,50%
Cinzas	7,00%
Uréase	0,25%

Fonte: IMCOPA, 2010

Casca de soja

A casca de soja é um subproduto da extração do óleo de soja, apresentando um elevado nível de fibra, um nível médio de proteína bruta e baixa energia, o que favorece a sua utilização para ruminantes e em rações que não necessitam de um alto teor de energia. Em animais não ruminantes a sua utilização é restrita devido ao alto teor de fibra. A composição da casca de soja é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição da casca de soja

PROPRIEDADE	VALOR
Proteína Bruta	13 – 14 (%)
Extrato Etéreo	2.5 – 3.0 (%)
Fibra Bruta	30 – 35 (%)
Matéria Mineral	4 – 6 (%)
Cálcio	0.4 – 0.5 (%)
Fósforo	0.15 – 0.20 (%)
Atividade Ureática	0.35 – 0.60

Fonte : POLI-NUTRI, 2010

3.2 Microrganismos

Bactérias, fungos e leveduras podem crescer em substratos sólidos e são aplicados em processos de FES. Os fungos filamentosos são utilizados na maioria dos casos, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (Soccol, 1994; Soccol e Vandenberghe, 2003).

Grande número de actinomicetos e culturas de leveduras bem como bactérias são conhecidos como produtores de giberelinas. Industrialmente os microrganismos preferidos são os fungos: *G. fujikuroi* (estágio sexuado) e *F. moniliforme* (estágio assexuado) também chamado de *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (NCBI, 2010).

Estes fungos são amplamente distribuídos em todo o mundo, e são particularmente associados com milho, onde podem causar podridão do colmo podridão da espiga e que resultam em perdas significativas na produtividade e reduções de qualidade dos grãos. Sua classificação já está bem estabelecida (NCBI, 2010), como mostrada a seguir:

TAXONOMIA

Superreino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota* (fungos verdadeiros)

Subfilo: *Pezizomycotina* (também chamados *Euascomycota*)

Classe: *Sordariomycetes* (também chamados *Pyrenomycetes*)

Subclasse: *Pyrenomycetideae*

Ordem: *Hypocreales*

Família: *Nectriceae*

Espécie: *fujikuroi*

Morfologicamente não se observa diferenças visíveis a olho nu nas características de *G. fujikuroi* ou *F. moniliforme*. A cor e forma de crescimento

destes fungos podem variar de acordo com o meio de crescimento utilizado, temperatura e a rotina de manuseio e manutenção das cepas.

Em meio BDA (Batata Dextrose Agar) inicialmente as culturas têm micélio branco, mas pode desenvolver pigmentos violeta com a idade. A pigmentação no agar varia, podendo não apresentar pigmentação ou pigmentação de cinzento laranja para cinza violeta, violeta escuro ou magenta escuro (Leslie e Summerell, 2006).

Ao microscópio ótico pode se observar uma diferença entre o estágio sexuado e assexuado deste fungo. A principal característica do *F. moniliforme* é a produção de conídios em forma de foice com extremidades afiladas constituindo fusos hialinos chamados macro ou microconídios (levemente curvos ou inclinados) (Godoy e Colombo, 2004) enquanto *G. fujikuroi* (sexuado) não apresenta este tipo de formação. Este tipo de formação em *F. moniliforme* está apresentado na Figura 9.

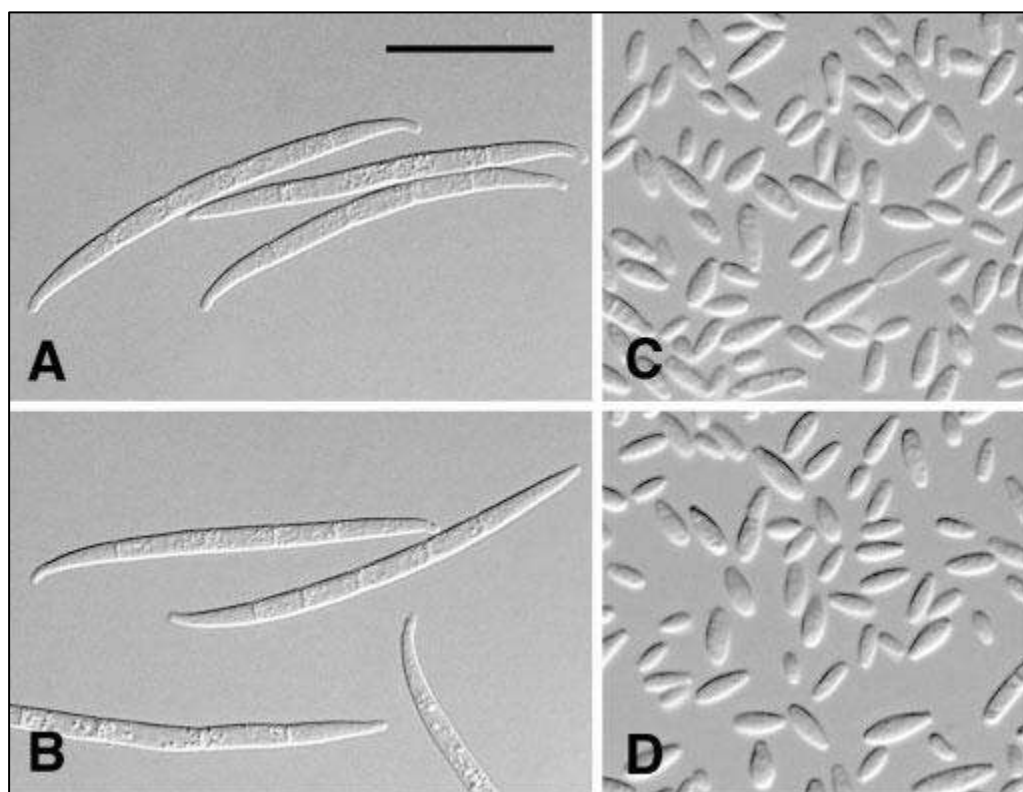


Figura 9. Macro e Microconídeos em *Fusarium*. A-B Macroconídeos e C-D Microconídeos; Barra de escala de 25 μ m

Fonte: Leslie e Summerell, 2006

Os rendimentos da produção de giberelinas obtidos com *G. fujikuroi* e *F. moniliforme* são baixos, e a otimização do processo bem como o melhoramento da cepa por seleção, mutação e técnicas de cruzamento são utilizados para se atingir maiores rendimentos e menores custos (Kumar e Lonsane, 1989; Machado *et al.*, 2001; Corona *et al.*, 2005).

4. FATORES FÍSICO-QUÍMICOS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE GA₃

Para que a obtenção do GA₃ seja viável comercialmente, vários fatores devem ser levados em consideração no processo fermentativo, como por exemplo, os constituintes do meio de cultivo, o pH, aeração, temperatura, umidade, macro e micro nutrientes disponíveis ao microrganismo, além da escolha do microrganismo a ser empregado. Assim todos estes fatores devem ser estudados de forma a otimizar a produção e diminuir os custos do processo.

4.1 pH

Em FES a medida de pH é complexa, assim existem poucos trabalhos que descrevem valores de pH utilizados na produção de GA₃. A faixa de pH recomendada pela maioria dos autores está entre 4,5 – 5,5. Gelmi *et al.* (2000), utilizaram amberlite como suporte inerte em FES com pH inicial de 4,5. Tomasini *et al.* (1997) utilizaram farinha de mandioca com pH inicial de 6,0. Machado *et al.* (2001) utilizaram casca de café e bagaço de mandioca como substrato/suporte para produção de GA₃ com pH inicial entre 5,0-5,4. Shukla *et al.* (2005) utilizaram farinha de arroz com pH inicial de 5,0.

4.2. Temperatura

O efeito da temperatura na produção de GA₃ parece ser independente do microrganismo utilizado embora a maioria dos estudos sejam desenvolvidos utilizando cepas de *G. fujikuroi*. Diferentes condições de temperatura foram

estudadas: 25°C (Gelmi *et al.*, 2002), 27°C (Gohlwar *et al.*, 1984), 28,5 a 29,5 °C (Borrow *et al.*, 1964a), 28 °C (Bandelier *et al.*, 1997), 29 °C (Machado *et al.*, 2002) e 30 °C (Escamilla *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2005).

4.3 Umidade

Na fermentação líquida o substrato está em suspensão dentro de uma fase aquosa, na qual este teor não é limitante. Na FES, o teor de umidade é considerado ótimo na saturação do substrato que normalmente varia entre 30 e 85% dependendo do substrato, a quantidade máxima de água no meio, neste caso, é função da capacidade de absorção do substrato.

O teor de umidade do substrato é uma das principais variáveis que influencia o sucesso de uma FES. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter no início e ao longo da fermentação.

O líquido no seio da matriz não deve ser muito abundante para não reduzir a porosidade e, conseqüentemente, limitar as trocas gasosas. No entanto, deverá estar presente suficientemente para não limitar o crescimento dos microrganismos (Singhania *et al.*, 2009).

4.4 Atividade de água (a_w)

O teor de água normalmente avaliado de modo gravimétrico, não diferencia a água disponível aos microrganismos da água de ligação ao substrato, não disponível aos microrganismos. A quantidade de água que realmente está disponível ao metabolismo do microrganismo pode ser avaliada pela atividade de água (a_w). A a_w de um meio é considerada um parâmetro importante na transferência de massa de água e solutos através da membrana celular. De fato, o controle desta variável pode ser utilizado no controle e modificação da atividade metabólica do microrganismo. Vários autores descrevem o conteúdo de umidade e

atividade de água, por FES e FSm, como variáveis críticas na limitação do crescimento microbiano, produção do metabolito e eficácia do produto (Pascual *et al.*, 1999; Magan, 2001; Valik e Pieckova, 2001). Corona *et al.* (2005) estudaram a disponibilidade de água durante FES de *G. fujikuroi* com farelo de trigo como substrato. Valores ótimos de crescimento de *G. fujikuroi* e produtividade de GA₃ foram estabelecidos em torno de a_w de 0,99.

4.5 Aeração

Uma vez que a biossíntese de giberelinas compreende vários passos oxidativos, catalisados pelas citocromo P450 monooxigenases, dioxigenases e desidrogenases, a aeração é um fator crítico na produção de GAs. Como a formação de biomassa, na fase de crescimento, segue uma cinética de primeira ordem (exponencial), a demanda de oxigênio também segue a mesma cinética. Porém, o espessamento do meio causado pela biomassa e a síntese de polissacarídeos no meio tendem a diminuir a transferência de oxigênio, afetando drasticamente o aumento da produção de GAs (Vass e Jefferys, 1979).

A aeração empregada na patente de Stodola *et al.* (1955) é de 0,25 vvm (volume-volume por minuto), independente do volume do reator, entretanto Holme e Zacharia (1965), preconizam valores diferenciados de 0,6 vvm para pequenos reatores de 5 litros e 0,25 vvm para reatores de 20 litros. Borrow *et al.* (1961) empregaram valores entre 0,3 e 0,5 vvm de ar tratado por 5 segundos em um esterilizador.

Bandelier *et al.* (1997) utilizaram um reator de batelada alimentada em FES com uma aeração de 0,9 L ar (h.kg de matéria seca)⁻¹ e Gelmi *et al.* (2000) empregaram aeração de 0,46 L ar (h.kg de matéria seca)⁻¹ em biorreator do tipo coluna de vidro. Neste mesmo tipo de biorreator, Machado *et al.* (2004) demonstraram que uma melhor produção de GA₃ pode ser alcançada com baixa taxa de aeração (0,24 L ar (h.kg de matéria seca)⁻¹) nas primeiras 72 h de fermentação seguida de aeração mais vigorosa (0,72 L ar (h.kg de matéria seca)⁻¹).

5. FATORES NUTRICIONAIS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE GA₃

A cinética de formação de biomassa e GA₃ foi primeiramente estudada por Borrow *et al.* (1964a). Durante a fase exponencial do crescimento, glicose, nitrogênio e fosfato são consumidos e não se observa a produção de GA₃. A maior produção de GA₃ é alcançada no ponto em que se tem uma concentração de nitrogênio limite suficiente para formação de biomassa e que não iniba a formação do hormônio (Brückner e Blechschmidt, 1991; Tudzynski, 1999).

5.1 Nitrogênio

A qualidade e a quantidade de nitrogênio no meio é muito importante na fermentação para produção de giberelinas. Altas produções de GA₃ foram alcançadas em baixas concentrações de nitrogênio no meio.

Bu'lock *et al.* (1974) sugeriram que a produção de giberelinas poderia ser atribuída à suspensão da fase de crescimento, por exaustão quer de sais nitrados quer de fosfatos. Para testar a hipótese foram realizados experimentos de produção de GAs em contingenciamento de fosfato e excesso de nitrogênio. Chegou-se à conclusão que embora grandes quantidades de nitrogênio inibissem a produção de GAs, a limitação de fosfatos afeta intensamente a produção de biomassa (Brückner, 1992). Candau *et al.* (1992) também apontaram que quando um micélio cresce em meio abundante em nitrogênio, ele só produz giberelinas quando é lavado e transferido para um meio contendo glucose livre e nenhum nitrogênio.

Fontes favoráveis de nitrogênio são sulfato de amônio, cloreto de amônio e fontes de assimilação mais lenta como glicina, tartarato de amônio, farinhas de origem vegetal e licor de milho (Darken *et al.*, 1959; Fuska *et al.*, 1961; Kumar e Lonsane, 1989). O uso de extratos de plantas é sugerido pois podem conter precursores ou indutores da síntese de GAs (Rademacher, 1997). Um exemplo é o ácido mevalônico que em concentrações de 60 mM pode aumentar a produção de GAs (Cihangir, 2002).

5.2 Fontes de Carbono

Glicose e sacarose são utilizadas como fonte de carbono, mas concentrações acima de 20% de glicose podem causar repressão catabólica (Borrow *et al.*, 1964a; Tudzynski, 1999). Alguns trabalhos utilizam fontes alternativas como maltose, manitol (Candau *et al.*, 1992), amido (Fuska *et al.*, 1961; Gelmi *et al.*, 2000) e farinha de origem vegetal ou misturas com diferentes fontes de carbono como, glicerol, glicose e galactose (Darken *et al.*, 1959; Pastrana *et al.*, 1995; Tomasini *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2005). Gancheva *et al.* (1984) obteve sucesso utilizando óleos vegetais como o óleo de girassol.

A influência da relação C:N está diretamente relacionada com o metabolismo de produção GA_3 . Assim, seus valores devem apresentar uma quantidade de nitrogênio mínima e suficiente para proporcionar um bom crescimento micelial bem como quantidade de carbono disponível suficiente para a produção do metabolito secundário. Portanto, a relação normalmente utilizada é alta, entre 6:1 e 45:1. Em FSm, é comum o uso de dois estágios no processo, sendo na fase inicial utilizada uma razão C: N entre 10:1 e 25:1 e na fase final varia de 25:1 a 200:1 (Borrow *et al.*, 1964; Jefferies, 1970; Kumar e Lonsane, 1989; Brückner e Blechschmidt, 1991; Candau *et al.*, 1992; Tudzynski, 1999; Shukla *et al.*, 2005).

5.3 Sais Minerais e Elementos-traço

Além de carbono e nitrogênio, magnésio, potássio, fosfato e sulfato também são necessários na biossíntese de metabólitos secundários. Não há muitos dados a respeito do efeito de elementos traço na produção microbiana de GA_3 . Normalmente os meios sintéticos utilizados como Czapek-Dox e Raulin-Thom já possuem quantidades suficientes destes elementos como impurezas dos produtos comerciais utilizados (Borrow, 1964a; Kumar e Lonsane, 1989; Brückner e Blechschmidt, 1991). Hanson (1967) e Mertz (1970) introduzem a ideia de

suplementação por oligoelementos (ferro, cobre, manganês, molibdênio, zinco, boro, alumínio e cálcio). Alguns minerais e elementos traço utilizados em fermentação para produção de GA₃ são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Sais minerais utilizados na produção de GA₃ por fermentação

Sais minerais	Concentração	Referências
KH ₂ PO ₄	3-7 g/L	Shukla <i>et al.</i> , 2005, Gelmi <i>et al.</i> , 2002, Escamilla <i>et al.</i> , 2000
	0.5 g/L 0.5 %	Berríos <i>et al.</i> , 2004 Lu <i>et al.</i> , 1995
K ₂ HPO ₄	5 g/L	Pastrana <i>et al.</i> , 1995
	0.0095 g/5.9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5 - 2 g/L	Shukla <i>et al.</i> , 2005, Escamila <i>et al.</i> , 2000, Corona <i>et al.</i> , 2005
	0.0053 g/5.9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0.45 g/L	Gelmi <i>et al.</i> , 2002
	0.07 g/L	Bandelier <i>et al.</i> , 1997
	0.1 %	Lu <i>et al.</i> , 1995
KCl	0.0048 g/5.9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
FeSO ₄	0.1 mg/5.9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0.07 g/L	Bandelier <i>et al.</i> , 1997
	10 mg/L	Lu <i>et al.</i> , 1995
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1.49 g/L	Corona <i>et al.</i> , 2005
	0.86 mg/5.9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0.07 g/L	Bandelier <i>et al.</i> , 1997
	10 mg/L	Lu <i>et al.</i> , 1995
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1.07 mg/5.9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0.07 g/L	Bandelier <i>et al.</i> , 1997
	10 mg/L	Lu <i>et al.</i> , 1995

6. EXTRAÇÃO, ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DO GA₃

6.1 Extração e Quantificação de GA₃

Durante o processo de fermentação para a produção de GA₃, giberelinas diferentes e outros metabólitos podem estar sendo sintetizadas com o GA₃. Para a identificação e quantificação de giberelinas pode-se utilizar uma variedade de métodos. Destes, dois são mais utilizados: o método espectrofotométrico e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O método espectrofotométrico (Tabela 9) é baseado na conversão do GA₃ em ácido giberelênico pela ação de ácidos fortes e a medida de sua absorbância a 254 nm. É um método rápido e específico para o GA₃, e é rotineiramente utilizado para a análise de caldos fermentados pela técnica de FSm.

Tabela 9 - Condições de extração e análise de GA₃ – Espectrofotometria UV

<i>Extração</i>	<i>Análise</i>	<i>Referência</i>
10 mL extrato, clarificado (0,5 mL slç de acetato de zinco, agitado, 0,5 mL de ferrocianeto de potássio, agitado, centrifugado por 15 min) 2,5 mL do sobrenadante transferido p/ balão de 100 mL contendo 7,5 mL etOH e 90 mL HCl (30%). Incubado a 20°C em banho Maria por 75 min	Leitura 254 nm em espectrofotômetro - UV	Lu <i>et al.</i> , 1995
Extração do metabólito com tampão fosfato pH 7,4 (V(mL) = m/2), agitação 20 min a 200 rpm, filtrado e novamente extraído. 30 mL do extrato transferido para balão volumétrico de 50 mL contendo 10 mL de etOH, adicionado 2 mL de acetato de Zn (repouso 2 min), 2 mL de ferrocianeto de potássio, completado o volume com água, repouso de 5 min. Filtrado e analisado	Leitura 254 nm em espectrofotômetro - UV	Machado, 2002.
1 mL da amostra e 1 mL de etOH são transferidos para balão de 10 mL, aferido com HCl 3,75 M e agitado vigorosamente por 10 s. A temperatura do processo é mantida a 20 ± 0,5 °C	Leitura 254 nm em espectrofotômetro - UV	Berrios <i>et al.</i> , 2004.

A CLAE promove separação de diferentes tipos de giberelinas com boa resolução, incluindo isômeros, além de uma quantificação precisa, sendo potencialmente atrativo para esses fitormônios polares e termicamente lábeis. UV convencional ou detecção de arranjo de diodos (PDA) tem sido utilizado em CLAE para a separação de fitormônios (Barendse e Van de Werken, 1980; Sandberg *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1991; Dobrev *et al.*, 2005) em amostras de plantas. As condições de análise podem variar (Tabela 10) sendo que dois tipos de colunas podem ser usados: μ Bondapak C18 e Radial-Pak-A. A fase móvel consiste de na maioria das vezes, metanol-água destilada acidificada com ácido fosfórico em pH 3, com detecção a 203 ou 206 nm (Barendse e Van de Werken, 1997; Castillo e Martinez, 1997).

Tabela 10 - Metodologias de extração e análise de ácido giberélico por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Condições de análise	Condições de extração	Referência
Coluna: fase reversa μ Bondapak C ₁₈ Detector: 203 nm Fase móvel: água bidestilada - 20% metanol, contendo 0,01 M H ₃ PO ₄ , pH 2,3 ajustado com KOH, 2 mL/min (foram estudadas variações para separação das GAs)	Padrão de ácido giberélico Sigma dissolvido em metanol	Barendse e Van de Werken, 1980.
Coluna: fase reversa μ Bondapak C ₁₈ Detector: UV a 206 nm	Extração a pH 2,5 1:3 (fermentado: solução de etanol a 10% (v/v)), agitado a 100 rpm por 1h a 25°C, clarificado, centrifugado, filtrado. O filtrado é diluído 1:1 em solução aquosa de metanol 40% (v/v).	Bandelier <i>et al.</i> , 1997.
Coluna: fase reversa C ₁₈ Detector: UV a 255nm Fase móvel: metanol contendo ácido acético 0,05% (20/80, v/v); gradiente linear por 20 min	Filtrado ajustado pH 2,5 e extraído por acetato de etila, evaporado a vácuo e o resíduo dissolvido em 1 mL de metanol. O GA ₃ é separado com preparativo HPLC e coletado a fração metanólica, evaporado	Nemat Alla e Hassan, 1998.

com concentração final completamente, dissolvido em 60/40 (v/v) – 1 mL.min⁻¹ – 100 µL de metanol. tempo de retenção de 17 min.
Injeção de 6 µL.

Coluna: C-18 temperatura ambiente 10 mL amostra extraída em tampão fosfato pH 2,5 com HCl Machado, 2000.
Detector: UV a 205nm 5% aferido em balão de 100 mL;
Fase móvel: mistura do passado em coluna com 250-300 solvente A (metanol) e mg de sílica C-18 (55-105µm), solvente B (água com pH 3,0 com ácido fosfórico), empacotada em pipeta Pasteur, passou-se 7 mL de metanol 20% eluição isocrática (0-15 min, diluído em água mili-Q sendo o slç A 70% e slç B 30%) – eluído descartado, 5mL solução fluxo de 1,00 mL.min⁻¹ metanol-água mili-Q 80% sendo esta a fração analisada.

Coluna: fase reversa 10 mL do extrato acidificado pH Escamilla *et al.*, 2000.
Bondapak C-18 a 25°C 2,5 com HCl 10% e extraído 3
Detector: UV a 204nm vezes com acetato de etila; a fase
Fase móvel: mistura 75% orgânica seca a vácuo e re- metanol e 25% tampão dissolvida em metanol; filtrado 3
KH₂PO₄ (75:25) - 1,8 vezes através de Sep Cartridge-
mL.min⁻¹ Pak Millipore, C-18 51910.

Coluna: C-18 marca Rainin 500 mg sílica C18 empacotada Chimelli , 2003.
Detector: UV a 205nm em seringa de 5mL em acetonitrila
Fase móvel: acetonitrila- por no min 12h, lavada com 5 mL
água (30:70) por 6min e de acetonitrila seguido de 10 mL
acetonitrila água (90:10) de mili-Q a vácuo. 5 mL de
nos últimos 13 min amostra passada pela coluna
(gravidade) seguido de 10mL de
mili-Q a vácuo. Eluição com
acetonitrila-água 80/20 e volume
completado para 5 mL.

Coluna: C-18 a 45°C Extrato filtrado em Millipore 0,45 Shukla *et al.*, 2005.
Detector: UV a 254nm µm com pH ajustado 2,5 com HCl
Fase móvel: 30% de 10%.
metanol contendo ácido
fosfórico a 0,01 M

A espectrometria de massa (EM) também é particularmente valiosa para a análise de GA_s. Devido à crescente disponibilidade de cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa (CG-EM), este método altamente sensível e seletivo de análise pode ser utilizado para a análise quantitativa das GAs endógenas (Rivier *et al.*, 1981; Pearce *et al.*, 1994, Taylor *et al.*, 2000;

Birkemeyer *et al.*, 2003). O inconveniente é que embora a abordagem de CG-EM mostre ótimo desempenho, os procedimentos de derivação de giberelinas são sempre indispensáveis para a separação por CG.

Neste sentido o recente desenvolvimento da cromatografia líquida (CL) combinada com o EM (CL-EM) permite a análise direta de compostos GA_s no eluente da CL, sem as modificações químicas necessárias para a análise por CG (Pearce *et al.*, 1994; Stephan *et al.*, 1999, Ma *et al.*, 2008).

6.2 Purificação do GA₃

Pouco se têm observado em literatura a respeito de métodos de purificação de GA₃ produzido por fermentação. Uma metodologia de purificação constitui na utilização de extração por solventes (também chamada de extração líquido-líquido ou partição).

Esta técnica consiste na passagem do analito de interesse de uma fase líquida (normalmente aquosa) para outra fase líquida (normalmente orgânica) com a qual o analito tem mais afinidade (maior solubilidade ou interação química). Após a extração é necessário uma etapa de concentração para eliminação do solvente e obtenção da molécula de interesse. Alguns autores utilizam esta técnica para limpeza da amostra e posterior análise do GA₃ produzido (Nemat Alla e Hassan, 1998; Escamilla *et al.*, 2000). Dentre os solventes orgânicos que solubilizam o GA₃, está o acetato de etila que é utilizado neste tipo de extração por ser imiscível em água. Rangaswamy *et al.* (2008) purificaram o GA₃ produzido por fermentação, submersa e FES, utilizando o processo de extração por acetato de etila com sucessivas concentrações por evaporação e posterior cristalização.

A extração em fase sólida pode também ser empregada na limpeza e concentração de diferentes metabólitos incluindo GA₃. Consiste na retenção de compostos da amostra por um agente de sorção sólido e posterior eluição por solvente adequado onde o analito é eluído. Pela escolha de eluentes adequados e, dependendo da natureza da amostra, é possível eluir seletivamente o analito.

Existem diferentes agentes de sorção sendo o mais utilizado as alquil-sílicas, particularmente as C8 e as C18 (cadeias de 8 ou 18 átomos de carbono ligados covalentemente aos grupamentos silanol da sílica), ideais para sorção de compostos de média ou pouca polaridade (Chimelli, 2003). Como regra, sílicas de cadeias alquílicas longas e finamente divididas, as quais formam grande superfície de adsorção, são usadas para a retenção de moléculas de baixo peso molecular, enquanto aquelas com cadeias curtas e poros grandes são usadas para sorção de macromoléculas.

Esta técnica é utilizada para preparar amostras contendo GA_3 a serem analisadas por CLAE (Machado, 2000; Escamilla *et al.*, 2000; Chimelli, 2003). Algumas resinas macroporosas comerciais também têm a capacidade de sorção e desorção de moléculas como GA_3 . Wang *et al.* (2008), estudaram a adsorção e desorção de GA_3 por resinas pouco polares alternativas (designadas como R) em comparação com resinas comerciais como a do tipo Amberlite XAD-16 (resina de poliestireno apolar). Os resultados demonstraram uma recuperação de 95% com solução aquosa de metanol como eluente, utilizando a resina designada R5.

Outra possibilidade de estudo é a utilização dos carvões ativados. Estes são materiais carbonosos porosos apresentando uma forma microcristalina, não gráfica, que sofreram um processamento para aumentar a porosidade interna. A característica do carvão que o destaca como bom agente de sorção é a larga superfície interna localizada dentro da rede de poros estreitos. Nestes poros ocorrerão a maior parte dos processos de adsorção sendo que o tamanho e forma dos poros também influenciam na seletividade através do efeito de peneira molecular (Rodriguez Reinoso e Sabio-Molina, 1998). O carvão ativado pode ser adquirido em pó ou granulado.

A aplicação dos materiais carbonosos porosos como adsorventes se baseia principalmente em suas propriedades texturais e em sua natureza química. As propriedades texturais dos carvões ativados se fundamentam em duas características importantes que são: tamanho de poro e a área superficial. Estas características definem a utilização dos carvões ativados e sua capacidade de adsorver e dessorver moléculas. As propriedades físicas da superfície são

descritas pela área superficial específica e porosidade, enquanto que as propriedades químicas dependem da presença ou ausência de grupos ácidos ou básicos sobre sua superfície (Moreno-Castilla, 2004). Assim os carvões ativados apresentam potencial para serem estudados na utilização em processos de limpeza e purificação de metabólitos produzidos por fermentação como o GA₃.

7. REFERÊNCIAS

ABIC – Associação Brasileira das Indústrias de Café – Disponível em: <<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>> Acessado em: 07 agosto 2010.

Alexopoulos A.A., Akoumianakis K.A., Vemmos S.N., Passam H.C. The effect of postharvest application of gibberellic acid and benzyl adenine on the duration of dormancy of potatoes produced by plants grown from TPS. *Postharvest Biology and Technology*. 2007; 46:54-62.

ANVISA – available in: www.anvisa.gov.br. Acessado em 05 mar.2007.

Arteca R.N. Plant growth substances-principles and applications. *Chapmann & Hall*, 1995.

Bandelier S., Renaud R., Durand A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in as aseptic pilot-scale reactor. *Process Biochemistry* 1997; 32:141-45.

Barendse G.W.M., Van de Werken P.H. High-Performance Liquid Chromatography of Gibberellins. *Journal of Chromatography*. 1980; 198:449-55.

Baumgartner S., Shah D., Schaller J., Kämpfer U., Thurneysen A., Heusser P., Reproducibility of dwarf pea shoot growth stimulation by homeopathic potencies of gibberellic acid. *Complementary Therapies in Medicine*. 2008; 16:183-91.

Berríos J., Illanes A., Aroca G. Spectrophotometric method for determinig gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology Letters*. 2004; 26:67-70.

Biasi L. A., Zanette F. Ácido giberélico isolado ou associado com cera na conservação pós-colheita da lima ácida "Tahiti". *Scientia Agraria*. 2000; v 1 39-44.

Birkemeyer C., Kolasa A., Kopka J. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *Journal of Chromatography A*. 2003; 993:89-102.

Blake P.S., Taylor D.R., Crisp C.M. Identification of endogenous gibberellins in strawberry, including the novel gibberellins GA123, GA124 and GA125. *Phytochemistry*. 2000; 55: 887-90.

Borrow A., Kessell R.H.J., Jefferys E.G. Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can J Microbiol*. 1961; 7:227-34.

Borrow A., Brown S., Jefferys E.G., Kessel R.J.H., Lloyd E.C., Lloyd P.B. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology*. 1964; 10:407-44.

Borrow, A.; Rothwell, B.; Rothwell, A. et al. Effect of varied temperature on kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol*. 1964a, 10, n. 3, p. 445-452.

Botelho R.V., Pires E.J.P., Terra M.M. Efeitos do thidiazuron e do ácido giberélico nas características dos cachos e bagas de uvas 'Niagara Rosada' na região de Jundiaí-SP. *Rev Bras Frutic*. 2003; 25:96-9.

Brasil, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/PROJECoes_AGRONEGOCIO/PROJECoes%20DO%20AGRONEGOCIO%20BRASIL%202008-2019.PDF. Acessado em: 15 set. 2009

Brückner B., Blechschmidt D. The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1991;11:163-92.

Brückner, B. Regulation of gibberellin formation by the fungus *Gibberella fujikuroi* In: Chadwick DJ, Whelan J (eds) Secondary metabolites: their function and evolution. (Ciba Foundation Symposium 171) Wiley, Chichester. 1992, 129-143.

Bu'lock, J.D.; Detroy, R.; Hostelak, Z. e Munin-Al-Shakardu, A. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Trans. Br. Mycol. Soc. v. 62, p. 377-389, 1974.

Bu'lock J.D. *Useful metabolites of Fusarium*. In: Moss MO, Smith JE (eds) The applied mycology of *Fusarium*. University Press, Cambridge. 1982; 1-12.

Buchanan B.B, Gruissem W., Jones R.L. (Eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants, *American Society of Plant Physiologists*. 2000.

Candau, R.; Avalos, J. e Cerdá-Olmedo, E. Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant. Physiol.* 1992, 100, 1184-1188.

Castillo G., Martinez S. Reversed-phase C₁₈ high-performance liquid chromatography of gibberellins GA₃ and GA₁. *Journal of Chromatography A*. 1997, 782, 137-139.

Celik I., Turker M., Tuluce Y. Abscicic acid and gibberellic acid cause increased lipid peroxidation and fluctuated antioxidant defense systems of various tissues in rats, *Journal of Hazardous Materials*. 2007; 30:623-9.

Cereda, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: Cereda, M. P. Industrialização da mandioca no Brasil. São Paulo: Paulicéia, p. 11-50, 1994.

Chang Jer-Chia, Lin Tzong-Shyan. GA₃ increases fruit weight in 'Yu Her Pau' litchi, *Scientia Horticulturae*. 2006; 108:442-43.

Chimelli M. Obtenção de giberelinas por biotransformação fúngica do esteviosídeo: etapa de deglicosilação. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2003.

Cihangir N.F. Stimulation of the gibberellic acid synthesis by *Aspergillus niger* in submerged culture using a precursor. *World J Microb Biot.* 2002; 18:727-29.

Corona A., Sanchez D., Agostin E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochemistry.* 2005; 40:2655-58.

Crocker, D. (2000) <http://www.plant-hormones.bbsrc.ac.uk/education/Keng.htm> Acessado em: 09/01/2000.

Darken M.A., Jensen A.L., Shu P. Production of Gibberellic Acid by Fermentation. *Applied Microbiology.* 1959; 7:301-3.

Davies P.J (Ed.). Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!, Kluwer Academic, Netherlands. 2004.

Dobrev P.I, Havlicek L., Vagner M., Malbeck J., Kaminek M. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2005; 1075: 159-66.

Escamilla E.M., Dendooven L., Magaña I.P., Parra R., De La Torre M. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *Journal of Biotechnology.* 2000; 76:147-55.

Ferri V. C., Rinaldi M. M., Silva J. A., Luchetta L., Marini L., Rombaldi C. V., Ácido giberélico no retardamento da maturação de caquis (*Diospyrus kaki*, L.), cultivar Fuyu. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 2004; 24(1); 001-005.

Fuska J., Kuhr I., Podojil M., Sevcik V. The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*. *Folia Microbiol.* 1961; 6:18.

Gancheva V., Dimova T.S., Kamenov K.E., Foutekova M. Biosynthesis of gibberellins. III. Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellins upon using mathematical methods for planning the experiments. *Acta Microbiol Bulgarica*. 1984; 14: 80.

Ge L., Peh C.Y.C., Yong J.W.H., Tan S.N, Hua L., Ong E.S. Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis–mass spectrometry combined with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1159:242–49.

Gelmi C., Pérez-Correa R., González M., Agosin E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochemistry*. 2000; 35:1227-33.

Gelmi C., Perez-Correa R., Agostin E. Modeling *Gibberella fujikuroi* growth and GA₃ production in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 2002; 37:1033-40.

Godoy P., Colombo A.L. Biologia e Relevância Clínica das Espécies do Gênero *Fusarium* spp. *Prática Hospitalar*. 2004; 34, jul-ago.

Gohlwar C.S., Sethi R.P., Marwaha S.S. Gibberellic-acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. *Enzyme Microb Tech*. 1984; 6:312-16.

Gonza'lez-Rossia D., Reig C., Juan M., Agustí M. Horticultural factors regulating effectiveness of GA₃ inhibiting flowering in peaches and nectarines (*Prunus persica* L. Batsch). *Scientia Horticulturae*. 2007; 111:352–57.

Hanson, J. R. New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. 12. Gibberellin a15. *Tetrahedron*. 1967, 23, n. 2, 733-739.

Hedden, P.; Macmillan, J. e Phinney, B.O. Metabolism of gibberellins *Annu. Rev. Plant. Phys*. 1978, 29, 149-192.

Hedden P., Phillips A.L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes, *Trends Plant Sci*. 2000; 5:523–29.

Hill T.A. Hormonas Reguladoras Del Crecimiento Vegetal. Barcelona: Ediciones Omega, S. A., 1977.

Hölker, U.; Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid – state fermentation with fungi. *Applied Microbiol. Biotechnology*. 2004, v.64, 175-186.

Hollmann D., Switalski J., Geipel S., Onken U. Extractive fermentation of Gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. *J Ferment Bioeng*. 1995; 79:594-600.

Holme T., Zacharia B. Gibberellic Acid Formation In Continuous Culture. *Biotechnol Bioeng*. 1965; 7:405-12.

Homann V., Mende K., Arntz C., Ilardi V., Macino G., Morelli G., Boèse G. e Tudzynski B. The isoprenoid pathway: cloning and characterization of fungal FPPS genes. *Curr. Genet.* v. 30, p. 232-239, 1996.

Hori S. "Bakanae Disease of Rice: Lectures on Plant Disease," Seibido, Tokyo, 1. ed. 1903. p.114.

IMCOPA – Disponível em: <http://www.imcopa.com.br/abertura-800.htm>. Acessado em: 05 mar. de 2010.

Jefferys E.G. The gibberellin fermentation. *Adv Appl Biol*. 1970; 13:283-316.

Jennings, R.C. e McComb, A.J. Gibberellins in red alga *Hypnea musciformis* (Wulf) Lamour. *Nature*. 1967, 215, n. 5103, 872-873.

Jennings, R.C. Gibberellins as endogenous growth regulators in green and brown algae. *Planta*. 1968, 80, n. 1, 34-35.

Jennings, R.C. Studies on regulation of algal growth by gibberellin. *Aust. J. Biol. Sci.* 1971, 24, n. 6, 1115-1121.

Júnior A.P.N., Filho J.C.S., Eustáquio I.M. Tiesenhausen V., Rocha G.P., Cappelle E.R., Filho C.C.C.C. Efeito de diferentes aditivos sobre os teores de proteína bruta, extrato etéreo e digestibilidade da silagem de maracujá. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. 2007; 31, n. 3, 871-875.

Kawaide H., Imai R.T., Sassa R. e Kamiya Y. ent-Kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. *J. Biol. Chem.* 1997; v. 272, p. 21706-21712.

Kios Y., Loewenthal H.J.E. Synthesis of compounds related to gibberellic acid .1. (+/-)-gibberone. *J Chem Soc.* 1963; 605-6.

Kumar P.K.R., Lonsane B.K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology.* 1989; 34:29-139.

Leslie J.F., Summerell B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*. Illustrated by Suzanne Bullock. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, U.S.A. 2006. First edition.

Lima L.P., Veloso C.M., Silva F.F., Bonomo P., Pinheiro A.A., Dutra G.S., Pereira Júnior I.G., Veloso J.M.C. Bagaço de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na dieta de vacas leiteiras: consumo de nutrientes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008; v.60, n.4, 1004-1010.

Lin J-T, Stanfford A.E, Steffens G., Murofushi N. Gradient C₁₈ high-performance liquid chromatography of gibberellins. *Journal of Chromatography.* 1991; 543:471-74.

Lu Z -X, Xie Z -C, Kumakura M. Production of gibberellic acid in *Gibberella fujikuroi* adhered onto polymeric fibrous carriers. *Process Biochemistry.* 1995; 30:661-5.

Ma Z., Ge L., Lee A.S.Y., Yong J.W.H., Tan S.N., Ong E.S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica ACTA.* 2008; 610:274-81.

Machado, C. M. M. Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bioresíduos da agroindústria do café. Curitiba, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2000.

Machado C.M.M., Oliveira B.H., Pandey A., Soccol C.R. Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. In: Book on Coffee Biotechnology and Quality, Sera T, Soccol CR, Pandey A and Roussos S (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 2001. p 401-8.

Machado C.M.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA₃) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA₃ em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2002.

Machado C.M.M., Soccol C.R. and Pandey A. Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002; 102:179-192.

Machado C.M.M., Oishi B., Pandey A., Soccol C.R. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. *Biotechnology Progress*. 2004; 20:1449-53.

Magan N. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: Bull T, Jackson C, Magan N, editors. Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International; 2001.

Mees G.C., Elson G.W. In: "Jealott's Hill-Fifty Year of Agricultural Research, 1928-1978" (F. C. Peacock, ed), Kynoch Press, Birmingham, England; 1978. p. 55-60.

Mende K., Homann V. e Tudzynski B. The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. *Mol. Genet*. 1997; v. 255, p. 96-105.

Merck Index. Rahway: Merk & co. Inc. 10. Ed. 1983. 1463 p.

Mertz, D. Light-stimulated incorporation of l-leucine into gibberellin of *Gibberella fujikuroi*. *Plant Cell Physiol.* 1970, 11, n. 2, 273-279.

Mesejo C., Martí'nez-Fuentes A., Reig C., Agustí M. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. *Plant Sci* 2008; 175:267-71.

Metivier J.R. Citoquininas e Giberelinas. In: FERRI, M. G. *Fisiología Vegetal*, vol. 2. São Paulo: E. P. U. EDUSP; 1979. 93-161.

Moreno-Castilla C. et al. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon.* 2004; v.42, 83-94.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=405761&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acessado em: 07 agosto 2010.

Nelson M. A., Morelli G., Carattoli A., Romano N. e Macino G. Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino-3) regulated by blue light and the products of white collar genes. *Mol. Cell Biol.* 1989; v. 9, p. 1271–1276.

Nemat Alla M.M., Hassan N.M. Efficacy of exogenous GA₃ and herbicide safeners in protection of *Zea mays* from metolachlon toxicity. *Plant Physiol Biochem*, 36(11); 1998. p. 809-815.

Ortega-Baes P., Rojas-Aréchiga M. Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): Light, temperature and gibberellic acid effects. *Journal of Arid Environments*. 2007; 69:169-76.

Otálvaro A.M., Gutiérrez G.D., Pierotty D.A., Parada F.A., Algecira N.A. Gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation of cassava bagasse and rice hull. *Abstracts/Journal of Biotechnology* 136S. 2008; S356–S401.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T.; Vandenberghe, L. P. S.; Mohan, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 2000, V. 74, p. 81-87.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2000a, 74, 69-80.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T.; Vandenberghe, L. P. S.; Mohan, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 2000b, 74, 81-87.

Pascual S., Melgarejo P., Magan N. Production of the fungal biocontrol agent *Epicoccum nigrum* by solid substrate fermentation: effect of water activity on accumulation of compatible solutes. *Mycopathologia*. 1999; 146:83-9.

Passos I.R.S., Matos G.V.C., Meletti L.M.M., Scott M.D.S., Bernacci L.C., Vieira M.A.R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2004; 26:380-81.

Pastrana L.M., González M.P., Torrado A., Murado M.A. A fed-batch culture model for improved production of gibberellic acid from a waste medium. *Biotechnology Letters*. 1995; 17: 263-8.

Pearce D.W., Koshioka M., Pharis R.P. Chromatography of gibberellins. *Journal of chromatography*. 1994; 658:91-122.

POLI-NUTRI – Disponível em
http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_janeiro.htm Acessado em: 06 de mar. 2010.

Rademacher W. Gibberellins. In: Fungal biotechnology. Chapman & Hall, London; 1997. p. 193-205.

Raimbault, M. General and microbial aspects of solid state fermentation. In- International training Course on Solid State Fermentation, FMS 97, 6-10 OCTOBRE, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

Rangaswamy V., Mumbai N., Balu G. Process for gibberellic acid production with “*Fusarium moniliforme*” strains. United States Patent Application Publication. 2008, Apr. 10, n US 2008/0085543 A1.

Rivier L., Kum-yul P.G., Albone S., MacMillan J. GC-MS identification of endogenous gibberellins and gibberellin conjugates as their permethylated derivatives. *Phytochemistry*. 1981; 20:687-92.

Rodriguez-Reinoso F.; Molina-Sabio M. Textural and chemical characterization of microporous carbons. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1998; v. 76-77, 271-294.

Sandberg G., Crozier A., Ernsten A., Sunberg B. HPLC and the analysis of indole-3-acetic acid and some of its decarboxylated catabolites in scots pine (*Pinus sylvestris* L.), in: Linskens HF, Jackson JF (Eds.), *Modern Methods of Plant Analysis: New Series-HPLC in Plant Sciences*, vol 5, Springer-Verlag, Germany; 1987.

Schmidt C. M., Bellé R. A., Nardi C., Toledo K. dos A. Ácido giberélico (GA₃) no crisântemo (*Dedranthema grandiflora* Tzvelev.) de corte “viking”: cultivo verão/outono. *Ciência Rural*. 2003; v 33; 267-274.

Serciloto C.M., Castro P.R.C. Use of Bioregulators on ‘Tahiti’ Lime (*Citrus latifolia* Tanaka). *LARANJA*, Cordeirópolis; 2001; 22:383-94.

Sharma R.R., Singh R. Gibberellic acid influences the production of malformed and button berries, and fruit yield and quality in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 2009, 119, 430–433.

Shukla R., Chand S., Srivastava A.K. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36:492-7.

Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44; 13-18.

Soccol, C. R. Contribuição ao estudo da fermentação sólida em relação à produção de ácido fórmico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do gênero *Pleurotus*. Curitiba. Tese (Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 1994.

Soccol C.R. Biotechnological products from cassava roots by solid-state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1996a; 55:358- 64.

Soccol, C. R. Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido. Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Engenharia Química, 1996. Livro de resumos. Lavras, MG. 1996b.

Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil, *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 13:205-18.

Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Medeiros A.B.P., Karp S.G., Buckeridge M., Ramos L.P., Pitarelo A.P., Ferreira-Leitão V., Gottschalk L.M.F., Ferrara M.A, Bon E.P.S., Moraes L.M.P., Araújo J.A., Torres F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*. 2010; 101, 4820–4825.

Stephan M., Bangerth F., Schneider G. Quantification of endogenous gibberellins in exudates from fruits of *Malus domestica*. *Plant Growth Regul*. 1999; 28:55-8.

Stodola F.H., Raper K.B., Fermeli D.L., Conway H.F., Johns V.E., Langford C.T., Jackson R.W. Microbiological production of gibberellins A and X. *Arch Biochem Biophys*. 1955; 54: 240-5.

Taiz L, Zeiger E (Eds.). *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA; 1998.

- Takahashi Y. Chemistry of plant hormones. CRC Press, Boca Raton; 1986. p. 277.
- Taylor D.R., Blake P.S., Crisp C.M. Identification of gibberellins in leaf exudates of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Growth Regul.* 2000; 30:221-3.
- Teixeira F.A., Pires A.V., Nascimento P.V.N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos (Sugarcane pulp in the feeding of bovine). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. 2007; vol VIII; n 6. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607.html>. Acessado em: 08 agosto 2010.
- Tomasini A., Fajardo C., Barriosgonzalez J. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 1997; 13:203-6.
- Tucker G.A., Roberts J.A. (Eds.). Plant Hormone Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ; 2000.
- Tudzynski B. e Höltter K. The gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene e cluster. *Fungal Genet. Biol.* v. 25, p. 157-170, 1998.
- Tudzynski B., Kawaide H. e Kamiya Y. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Curr. Genet.* 1998; v. 34, p. 234-240.
- Tudzynski B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol. Biot.* 1999; v. 52, n. 3, p. 298-310, SEP.
- União Farelos – disponível em www.uniãofarelos.com.br/. Acessado em 10 de Abril de 2010.
- Valik L., Pieckova E. Growth of hat-resistant fungi: the effect of water activity. *Int J Food Microbial* 2001; 63:11-7.

Vandenberghé, L.P.S. Développement d'un procédé pour la production d'acide citrique par fermentation en milieu solide à partir de résidus de l'agro-industrie du manioc. Compiègne. 205 f. These (Docteur de l'UTC) - Université de Technologie de Compiègne, 2000.

Vandenberghé, L.P.S; Soccol, C. R; Pandey, A.; Lebeault, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 2000a, 74, n. 2, 175-178.

Vass R.C., Jefferys E.G. Gibberellic Acid, In-Economic microbiology: secondary products of metabolism. vol 3, AH Rose (ed), Academic Press, London; 1979. p. 421-33.

Wang, R. Yang, J., Shi Z, Ou L. Separation of gibberellic acid (GA_3) by macroporous adsorption resins. *Front. Chem. Eng. China*. 2008, 2(2), 171-175.

Woitek S.: Unkles S.E., Kinghorn J.R. e Tudzynski B. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA reductase gene e of *Gibberella fujikuroi*: isolation and characterization. *Curr. Genet*. 1997; v. 31, p. 38-47.

CAPÍTULO I

SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS/SUPORTES PARA PRODUÇÃO DE GA₃ EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

RESUMO

A seleção de cepas (quatro cepas de *Gibberella fujikuroi* e uma cepa de *Fusarium moniliforme*) e substratos/suportes (polpa cítrica (PC), casca de soja (CS), bagaço de cana (BC), farelo de soja (FS), bagaço de mandioca (BM) e casca de café (CC)) foi realizada em fermentação no estado sólido (FES). O substrato/suporte selecionado foi caracterizado físico-quimicamente. Para a quantificação do GA₃ foram conduzidos estudos das etapas de extração e análise por espectrofotometria. Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos de Erlenmeyer a 29 °C, com umidade inicial de 75-80% dependendo da capacidade de absorção de cada substrato. A análise do GA₃ produzido foi feita por espectrofotometria a 254 nm após acidificação da amostra. A maior produção (5,7 g de GA₃/kg de substrato seco) foi alcançada com a utilização da cepa *F. moniliforme* LPB 03 e o substrato/suporte PC (75% de umidade inicial) após 7 dias de fermentação, sendo esta condição escolhida para dar continuidade aos estudos. Também foram analisadas as características físico-químicas da PC que se apresentaram condizentes com o observado em literatura. Quanto à extração e análise foram testados: relação massa de fermentado e volume de tampão, o pH de extração, formas de agitação, e tempo de agitação. O tempo disponível para análise em espectrofotômetro (254 nm), durante a acidificação da amostra, foi estabelecido em 60 a 80 min. Na extração os melhores resultados foram obtidos com 1 g de fermentado extraído em 3 mL de tampão fosfato (pH 7,4) sob agitação em extrator mecânico durante 20 min.

Palavras-chave: ácido giberélico, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium moniliforme*, resíduos agro-industriais, extração, espectrofotometria

1. INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de resíduos e subprodutos da agroindústria é gerada anualmente no mundo e em especial no Brasil, já que é um país que tem na agricultura uma das principais atividades econômicas. A agricultura representa 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos brasileiros (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2005). A FES utiliza estes resíduos como substratos/suportes para produção de diferentes biomoléculas de interesse comercial. Desta forma além de agregar valor, também ajuda a resolver problemas ambientais causados pela deposição destes resíduos no meio ambiente.

A escolha do substrato/suporte a ser utilizado em processos fermentativos, interfere em vários fatores que vão desde a disponibilidade dos componentes do substrato como nutrientes a serem utilizados pelo microrganismo até a presença de substâncias tóxicas ao microrganismo ou inibidoras da produção do metabólito desejado, entre outras. Assim a caracterização do substrato/suporte a ser utilizado em FES, é importante, pois este deve ter algumas características ideais que possibilitem o maior rendimento do processo. Porosidade, tamanho e forma das partículas, atividade de água, teor de carbono e relação carbono/nitrogênio do meio de fermentação devem ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo. Estudos no sentido de elucidar tais características, devem ser realizados preferencialmente no início dos estudos de sua utilização em FES. Isto se deve ao fato dos resíduos e subprodutos da agroindústria apresentarem variações em suas propriedades devido à origem, safra e manuseio utilizado em seus processos de obtenção.

Desta forma esta etapa do trabalho apresentou como objetivo a escolha do substrato/suporte para produção de GA₃ em FES, sua caracterização e a seleção de uma cepa para este fim. A escolha da cepa faz-se necessária já que existem diferentes microrganismos produtores de GA₃ com habilidades diversas para produzir giberelinas. Também foi definido um protocolo de extração e análise do

metabólito de forma a estabelecer uma rotina a ser seguida no decorrer dos trabalhos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Cepas de *Gibberella fujikuroi* (LPB 02, LPB 05, LPB 06, LPB Bca) e *Fusarium moniliforme* (LPB 03) provenientes do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, foram conservadas em tubos contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar). Estas cepas foram incubadas a 28 °C por 6 dias e conservadas a 4 °C por no máximo 2 meses.

2.2 Substratos/suportes

Seis resíduos agro-industriais foram utilizados neste estudo: polpa cítrica (PC) da Coalma Nutrição Animal SP; casca de soja (CS) e farelo de soja (FS) da Imcopa PR, bagaço de cana-de-açúcar (BC), bagaço de mandioca (BM) e casca de café (CC) do Café Damasco PR. Estes foram previamente secos, triturados em moinho de disco e peneirados de forma a obter uma granulometria entre 0,8 e 2 mm.

A CC foi pré-tratada com solução alcalina (KOH 0,25%, 100°C por 45 min) de forma a eliminar substâncias tóxicas naturalmente presentes em sua composição (Machado *et al.*, 2002).

2.3 Fermentação no Estado Sólido (FES)

Em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 10 g do(s) substrato(s)/suporte(s) foram impregnados com uma solução contendo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1 g/L), de forma a ajustar a umidade inicial de 70% para FS, 75% para CC, CS, PC e BM e 85% para BC. Para as combinações entre os

substratos/suportes, foi utilizada a maior umidade. A solução nutritiva acima citada foi estabelecida em trabalho anterior (Machado *et al.*, 2002). O pH foi ajustado entre 5,0 – 5,5 e o meio foi inoculado (10% - 20% v/m). Após homogeneização, o meio foi incubado durante 7 dias a 29 °C.

A seleção de cepas e substratos/suportes foi conduzida utilizando um planejamento experimental com seis fatores do tipo *Simplex-Lattice Design*. Neste tipo de planejamento experimental a influência de cada componente separadamente e sua mistura é analisada com relação à variável resposta. No experimento em questão foram analisados os substratos/suportes com relação à produção de GA₃. Para cada uma das cinco cepas estudadas empregou-se separadamente o mesmo planejamento experimental.

Os seis resíduos agro-industriais (previamente descritos) e a mistura entre eles na proporção 1:1(m:m), foram estudados para as cinco cepas nos níveis apresentados na Tabela 11. Nesta etapa o inóculo (15% v/m) foi obtido pelo crescimento das cepas em caldo Czapek por sete dias a 30 °C a 120 rpm.

Tabela 11- Níveis utilizados no planejamento experimental do tipo simplex-lattice para a escolha do substrato/suporte

Substrato/suporte*	0	níveis 1/2	1
PC; BM; FS; CS; CC e BC	0%	50%	100%

* polpa cítrica (PC), farelo de soja (FS), bagaço de cana de açúcar (BC), casca de soja (CS), bagaço de mandioca (BM) e casca de café (CC).

2.4 Caracterização do Substrato/Suporte - PC

A PC utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pela empresa Coalma Nutrição Animal SP, estando peletizada e seca. Todas as análises foram desenvolvidas nos Laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (LPB I e II) da UFPR, a exceção das análises de cátions que foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas (LPH) da UFPR.

As análises das características físico-químicas: umidade (termogravimétrico), cinzas (termogravimétrico) e proteínas (método de Kjeldahl) foram realizadas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SES, 1985).

Para a quantificação dos açúcares fermentescíveis foram realizadas dosagens pela metodologia de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945).

As medidas de pH foram realizadas com o preparo de uma suspensão com 5g do substrato em 50 mL de água a qual foi agitada durante 15 minutos, com posterior medida do pH pelo método potenciométrico.

As medidas de a_w da PC foram realizadas em equipamento próprio a este fim da marca Aqua Lab modelo CX-2.

2.4.1 Cátions e Ânions

Os cátions (Fe, Cu, Zn, Na, K e Mg) foram quantificados por absorção atômica em espectrofotômetro da marca Varian, modelo Spectr AA-100.

Os ânions (fluoreto, nitrato, fosfato e sulfato) foram quantificados em cromatógrafo de íons da marca Metrohm modelo 761 Compact IC. Foi utilizada a coluna Metrosep A Supp 5 e o detector 732 IC, sendo a fase móvel utilizada composta de 3,2 mM de Na_2CO_3 e 1,0 mM de NaHCO_3 , o volume injetado de 20 μL com uma vazão de 0,7 mL/min.

Os resultados de concentração foram calculados com relação a uma curva padrão obtida a partir da leitura de soluções com diferentes concentrações (1, 2, 5, 7 e 10 ppm) dos seguintes ânions: F, Cl, Br, NO_3 , SO_4 e PO_4 .

Preparo das amostras para análise de cátions e ânions

Para a análise dos cátions por absorção atômica, 1 g de PC (previamente seca e moída a uma granulometria menor do que 5 mm) foi digerido totalmente utilizando HNO_3 concentrado e água na proporção 1:1. Após a digestão a amostra

foi aferida com água em balão volumétrico de 100 mL e filtrada em membrana de 0,2 µm de porosidade.

Para a análise de ânions foi analisado o extrato de PC (produzido como descrito no item 2.1.4 deste capítulo) após diluição de 10 vezes em água com posterior filtração em membrana de 0,2 µm de porosidade.

2.5 Extração e Análise

Na etapa de seleção de cepas e substratos/suportes a extração do GA₃ produzido foi realizada com 15 g do material fermentado em 45 mL de tampão fosfato de sódio (pH 8,0) homogeneizado em agitador mecânico por 20 min e em seguida, filtrado. O filtrado foi clarificado de acordo com o método descrito por Holbrook (Holbrook *et al.*, 1961) sendo que 2,5 mL da solução clarificada foi acidificada em balão volumétrico de 100 mL, aferido com solução aquosa de HCl (30%) e mantido por 75 min a 20 °C. A análise foi realizada em espectrofotômetro a 254 nm. O tempo de acidificação foi estudado através de cinética onde o espectro de varredura foi analisado com relação à absorção de padrão de GA₃ entre 200 e 400 nm a cada 10 min.

Nesta etapa a cepa *F. moniliforme* LPB 03 foi cultivada em FES com PC como substrato/suporte impregnado com uma solução contendo FeSO₄.7H₂O (0,3 g/L) e (NH₄)₂SO₄ (0,1 g/L), de forma a ajustar a umidade inicial de 75%. O pH inicial foi ajustado para 5,0 – 5,5 e a fermentação ocorreu em sete dias a 29 °C .

A etapa de extração foi posteriormente otimizada sendo estudados a relação massa de fermentado e volume de tampão (1:2, 1:3 e 1:4) e posteriormente o pH de extração, mecanismos de extração e tempo de agitação foram estudados utilizando um planejamento experimental do tipo Fatorial Incompleto de 3⁽³⁻¹⁾ com 3 repetições do ponto central (Tabela 12).

Tabela 12 - Variáveis e respectivos níveis utilizados no planejamento experimental realizado na otimização da extração do GA₃ produzido

<i>Variáveis</i>	<u>níveis</u>		
	-1	0	+1
pH do tampão	7,0	7,4	7,8
Mecanismos de extração	Shaker a 120 rpm	Agitador mecânico	Agitador magnético
Tempo de extração	10 min	20 min	30 min

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de Cepas e Substrato/Suporte para Produção de GA₃ por FES

Neste estudo foi realizada a seleção de uma cepa de *Giberella fujikuroi* ou de *Fusarium moniliforme* (Figura 10), capaz de produzir altas concentrações de GA₃ em FES bem como a escolha de um substrato/suporte adequado ou de uma mistura de substratos/suportes.

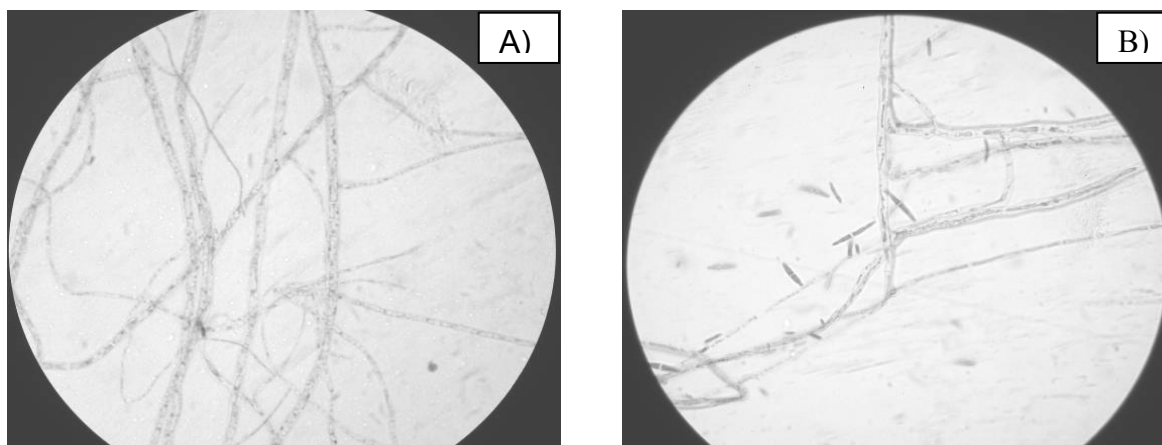


Figura 10 – Fotos de duas cepas cultivadas em meio BDA observadas ao microscópio ótico com aumento de 100X. A) *Giberella fujikuroi* LPB BCA (estágio sexuado) e B) *Fusarium moniliforme* LPB 03 (estágio assexuado)

Fonte: A autora

O maior acúmulo de GA₃ foi obtido com a utilização da cepa *F. moniliforme* LPB 03 (5,7g de GA₃/kg de PC seca), seguido por *G. fujikuroi* LPB 06 (4,7g de GA₃/kg de FS:CC secos).

A Tabela 13 apresenta os resultados da produção de GA₃ com as cinco linhagens estudadas utilizando as combinações dos seis substratos.

Tabela 13 - Resultados obtidos de produção de GA₃ (g/kg de resíduo seco) por FES utilizando seis substratos e suas misturas para as cinco cepas estudadas

Substrato/suporte	Cepas				
	LPB 02	LPB 03	LPB 05	LPB 06	LPB Bca
PC	3.9	5.7	3.8	3.1	3.5
BM	0.5	0.5	0.3	1.1	0.8
FS	0.0	3.8	0.0	0.0	3.4
CS	3.7	2.8	1.8	1.8	2.8
CC	3.1	0.8	2.9	2.8	3.3
BC	0.7	1.0	2.4	1.5	0.9
PC+BM	1.5	2.9	0.3	1.3	1.9
PC+FS	4.0	1.0	1.9	0.0	0.0
PC+CS	3.9	5.0	3.7	3.0	3.0
PC+CC	2.4	4.3	1.1	3.1	4.0
PC+BC	2.0	1.5	0.0	1.1	0.7
BM+FS	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0
BM+CS	3.5	3.1	0.5	0.0	1.5
BM+CC	1.4	2.2	2.2	2.2	3.0
BM+BC	0.7	1.3	2.2	0.9	1.1
FS+CS	1.2	1.1	2.6	4.7	3.2
FS+CC	1.2	0.9	3.6	4.3	3.5
FS+BC	1.1	0.8	1.5	0.0	0.8
CS+CC	3.4	3.6	3.1	1.3	2.6
CS+BC	0.0	0.0	2.2	2.3	3.0
CC+BC	2.3	2.2	1.1	0.4	1.7

polpa cítrica (PC), farelo de soja (FS), bagaço de cana de açúcar (BC), casca de soja (CS), bagaço de mandioca (BM) e casca de café (CC).

No que diz respeito aos substratos, a PC apresentou muito bons níveis de produção de GA₃, sendo produzido acima de 3,1 g de GA₃/kg de PC seca com todas as cepas estudadas.

Analizando os resultados (Tabela 13) obtidos para os substratos e suas misturas, a melhor combinação utilizada foi PC:CS com produções superiores a 3,0 g de GA₃/kg de substrato seco para todas as cepas chegando a 5,0 g de GA₃/kg de substrato seco, quando utilizado a mistura de PC:CS. Ao contrário, a combinação de BM:FS não apresentou produção, exceto com a utilização da cepa *G. fujikuroi* LPB 02, que produziu 1,1 g de GA₃/kg do BM:FS secos. Na mistura de BM:FS a relação C:N apresenta-se equilibrada o que também não é uma boa condição para o processo.

Se usados isoladamente, os substratos BM e BC apresentaram os piores resultados. Para o BM a produção foi de 1,1 g de GA₃/kg de BM seco com a utilização da cepa *G. fujikuroi* LPB 06 e para BC foi de 2,4 g de GA₃/kg de BC seco, utilizando a cepa *G. fujikuroi* LPB 05. Estes dois resíduos apresentam grande quantidade de carboidratos, mas pequena quantidade de nitrogênio em sua composição (Tabela 14). Esta relação não proporcionou o crescimento mínimo necessário ao microrganismo para um maior acúmulo de GA₃.

Por outro lado, o FS (máximo de 3,8 g de GA₃/kg de FS seco utilizando *G. fujikuroi* LPB 03), a CS (máximo de 3,7 g de GA₃/kg de CS seco utilizando *G. fujikuroi* LPB 02), e a CC (máximo de 3,3 g de GA₃/kg de CC seco utilizando *G. fujikuroi* LPB BCA), têm uma grande quantidade de N na sua constituição, o que lhes confere uma baixa relação C:N (Kagawa, 1995; Machado *et al.*, 2001) em relação ao BM e PC.

Segundo Escamilla *et al.* (2000), a produção de giberelinas começa quando a quantidade de nitrogênio disponível for esgotada e continua com uma concentração suficiente de carbono disponível para manutenção das células e síntese do metabólito. Desta forma, os substratos devem apresentar uma quantidade de nitrogênio inicial limitada, mas equilibrada a fim de proporcionar suficiente crescimento micelial para o início da produção de GA₃. Além disso, o

acúmulo de concentrações maiores do metabólito será iniciado na presença de substrato que possua maiores quantidades de carbono disponível.

Assim neste trabalho foi observado um maior acúmulo de GA₃ com a utilização de PC como substrato/suporte. Este fato pode ser devido à presença de 5% e 19% de proteínas e carboidratos, respectivamente (Rodrigues, 2006) e, conseqüentemente, uma relação C:N que proporcionou um bom crescimento micelial com acúmulo posterior do metabólito em níveis satisfatórios.

Tabela 14 - Quantidade de nitrogênio orgânico e carboidratos totais dos substratos estudados

Substrato/suporte	Nitrogênio Orgânico	Carboidratos	Referência
PC*	5%	19%	Rodrigues, 2006
BM*	0,24%	67%	Vandenberghe <i>et al.</i> , 2000
FS*	48%	-	IMCOPA, 2007
CS*	13 – 14%	-	POLINUTRI, 2007
CC*	10,9%	17,4%	Souza <i>et al.</i> , 2001
BC*	0 – 0,3%	39,7 - 49%	Castro <i>et al.</i> , 2008

* polpa cítrica (PC), farelo de soja (FS), bagaço de cana de açúcar (BC), casca de soja (CS), bagaço de mandioca (BM) e casca de café (CC).

A avaliação das diferentes composições dos substratos e suas combinações foi determinante para a seleção de uma cepa e substrato que proporcionasse um maior acúmulo de GA₃. Assim, foi selecionada a cepa *F. moniliforme* LPB 03 e o substrato/suporte PC, os quais indicam boas perspectivas para a continuidade dos estudos com o objetivo de melhorar as condições do processo em questão.

3.2 Caracterização Físico-Química da PC

Os resultados obtidos nas análises das características físico-químicas: umidade, cinzas, proteínas, pH, açúcares e a_w da PC, estão relacionados na Tabela 15.

Tabela 15 – Características físico-químicas da PC utilizada

<i>Umidade %</i>	<i>Cinzas %</i>	<i>Proteínas %</i>	<i>pH</i>	<i>Açúcares Totais%</i>	<i>a_w</i>
11,42±0,128	7,89±0,058	6,30±0,179	5,76±0,083	20,22±1,091	0,660±0,002

As análises de umidade, cinzas e proteínas demonstraram resultados condizentes com a literatura, onde os valores máximos permitidos são de 12,0% (Abecitrus, 2006) e de 8.0% (Abecitrus, 2006; União Farelos, 2010) para umidade e cinzas, respectivamente. O valor encontrado para nitrogênio protéico está dentro do valor mínimo exigido de 5,0% (Abecitrus, 2006).

O pH da PC de 5,76 está próximo ao utilizado normalmente para o processo de produção de GA₃ em FES entre 4,5 e 5,5 (Gelmi *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001). Para a correção de pH do substrato será necessário menor quantidade de ácido e/ou base o que é economicamente favorável.

Realizou-se análise da a_w da PC obtendo-se um valor de 0,660±0,002, o que foi considerado satisfatório pois está abaixo do ideal para o desenvolvimento de microrganismos. Tal característica ajuda a evitar contaminações indesejáveis durante a estocagem. No entanto, a umidade inicial deverá ser ajustada para uso em fermentação como substrato/suporte.

A quantidade de açúcares (20,22%±1,091) encontrada, propicia a sua utilização como substrato em FES. Além disso, a relação C:N apresenta-se alta o que favorece a produção do GA₃ (Escamilla *et al.*, 2000).

3.2.1 Cations e ânions

Os resultados obtidos da quantificação de cátions analisados na PC estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados da quantificação de cátions presentes na PC utilizada

<i>Cátions analisados</i>	<i>PC estudada (mg/kg)</i>	<i>Abaissa, 2008 (mg/kg)</i>
Fe	174,5	100,0 - 200,0
Cu	8,4	5,0 – 10,0
Zn	8,2	5,0 – 10,0
Na	180,0	200,0 – 1500,0
K	6 880,0	800,0 – 13 000,0
Mg	868,0	1 000,0 – 2 000,0

A quantificação dos cátions presentes na PC em estudo, foi condizente com o encontrado em literatura, a exceção dos cátions Na e Mg que se apresentaram em menor quantidade.

Com relação a quantificação de ânions, foram encontrados fluoreto (100,11 mg/kg), nitrato (375,76 mg/kg), fosfato (149,16 mg/kg) e sulfato (201,74 mg/kg). Estes resultados foram considerados satisfatórios visto que, os ânions fosfato e sulfato são os mais utilizados na constituição de meios para produção de GA₃ (Gelmi *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2005) e nitratos também são utilizados em meios sintéticos de produção de inóculo como o meio Czapek. Fluoretos não são citados em literatura, em seu lugar são utilizados cloretos os quais não foram encontrados na PC em estudo.

Esta composição justifica a utilização do extrato de PC como possível meio de produção do inóculo, em substituição ao meio de caldo Czapek, pois a PC já apresenta em sua composição os cátions e ânions (a exceção do cloreto) que fazem parte da formulação do caldo Czapek (NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄, KCl e FeSO₄).

3.3 Otimização da Extração e Estudo da Análise por Espectrofotometria

O estudo da extração de uma biomolécula é de extrema importância, mesmo que já exista um protocolo estabelecido para esse fim. Isso porque cada fermentado tem suas particularidades, que dependem não somente do produto obtido, mas também do substrato, do microrganismo e das condições utilizadas.

3.3.1 Relação massa de fermentado e volume de tampão fosfato de sódio

A relação massa de fermentado e volume de tampão fosfato, utilizada na extração, foi estudada de forma a garantir a maior quantidade de GA₃ extraído no menor volume de solução. As relações estudadas foram 1:2, 1:3 e 1:4 (m/v) sendo que os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados do estudo da relação massa do fermentado e volume do tampão fosfato utilizado na extração

<i>Relação (g:mL)</i>	<i>Quantidade de GA₃ (g/kg de PC seca)</i>
1:2	3,79 ± 0,19
1:3	5,64 ± 0,19
1:4	5,60 ± 0,17

As melhores relações entre massa de fermentado e volume de tampão foram 1:3 e 1:4 com as quais se obteve rendimentos muito próximos em torno de 5,6 g de GA₃/kg de PC seca. Desta forma foi escolhida a relação de 1 g de fermentado extraído com 3 mL de tampão fosfato com a qual se obteve a maior quantidade de GA₃ extraído no menor volume de tampão (extrato mais concentrado).

3.3.2 Mecanismo de extração, pH do tampão fosfato de sódio e tempo de extração

Os resultados do estudo do mecanismo de extração, pH do tampão e tempo da extração foram submetidos à análise estatística (Tabela 18) onde o R^2 obtido foi de 0,90.

Tabela 18 – Anova da otimização da extração de GA₃ do material fermentado

<i>Fator</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Médias Quadradas</i>	<i>Razão f</i>	<i>Razão p</i>
(1) pH (L)	2,331267	1	2,331267	8,643819	0,032255
pH (Q)	2,997563	1	2,997563	11,1143	0,020692
Mecanismo de extração (L)	0,326667	1	0,326667	1,211207	0,321233
Mecanismo de extração Q)	1,242563	1	1,242563	4,607146	0,084627
Tempo de agitação (L)	1,47015	1	1,47015	5,450989	0,066816
Tempo de agitação (Q)	0,38025	1	0,38025	1,409882	0,288405

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (10%)

Com a análise da ANOVA percebe-se que as variáveis significativas foram o pH (linear e quadrático), o tempo de agitação (linear) e o mecanismo de extração (quadrática) o que foi comprovado também pela análise do diagrama de Pareto (Figura 11). As três variáveis estudadas foram consideradas significativas

em $p < 0,1$ (confiabilidade de 90%). Dentre estas, o pH do tampão de extração apresentou diferenças expressivas nos resultados de extração (Tabela 19).

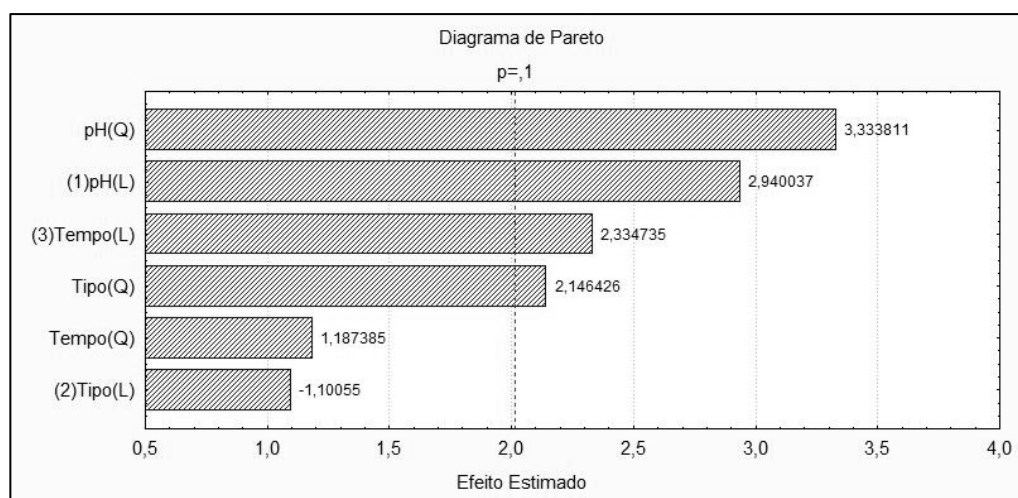


Figura 11- Diagrama de Pareto dos resultados obtidos do estudo de quantidade de GA₃ extraído utilizando diferentes pHs, formas e tempos de agitação

Na extração de um metabólito é interessante utilizar solventes que apresentem baixa volatilidade e pouca toxidez (menos riscos ao ser manipulado). Como o GA₃ é prontamente solúvel em alguns solventes orgânicos e em soluções aquosas alcalinas (Kumar e Lonsane, 1989), a extração em tampão foi escolhida e o estudo da faixa de pH que ofereça uma melhor solubilização do metabólito, faz-se necessário.

Tabela 19 – Resultados do estudo de quantidade de GA₃ extraído utilizando diferentes pHs, formas e tempos de agitação

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Tipo de extrator*</i>	<i>Tempo de extração (min)</i>	<i>GA₃ (g/kg de PC seca)</i>
1	7,0 (-1)	S (-1)	10 (-1)	2,92
2	7,0 (-1)	M (0)	30 (+1)	3,39
3	7,0 (-1)	MG (+1)	20 (0)	2,92
4	7,4 (0)	S (-1)	30 (+1)	5,21
5	7,4 (0)	M (0)	20 (0)	5,59
6	7,4 (0)	MG (+1)	10 (-1)	3,18
7	7,8 (+1)	S (-1)	20 (0)	4,06
8	7,8 (+1)	M (0)	10 (-1)	4,22
9	7,8 (+1)	MG (+1)	30 (+1)	4,69
10	7,4 (0)	M (0)	20 (0)	5,78
11	7,4 (0)	M (0)	20 (0)	5,57
12	7,4 (0)	M (0)	20 (0)	5,63

* S = shaker; M = agitador mecânico; MG = agitador magnético

Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito em literatura já que em pH neutro observou-se a menor quantidade de GA₃ extraída (aproximadamente 3 g de GA₃/kg de PC seca). O rendimento da extração aumenta a medida que aumentam os valores de pH, com os melhores resultados obtidos com a utilização de tampão fosfato em pH 7,4 (5,6 g de GA₃/kg de PC seca).

Quanto ao mecanismo de extração, o agitador mecânico apresentou agitação mais vigorosa do que o shaker e mais constante do que o agitador magnético. Além de uma boa agitação, proporcionou uma homogeneização mais efetiva devido à trituração, diferente do que acontece com o shaker e o agitador magnético.

Desta forma foi escolhido o pH 7,4 do tampão fosfato com extração em agitador mecânico durante 20 min, uma vez que este tempo de extração foi o menor tempo estudado para o máximo de extração do metabólito (5,6 g de GA₃/kg

de PC seca). Estas condições foram as utilizadas no ponto central dos experimentos. Com isso, as condições ideais dentro da faixa de estudo foram a de pH 7,4 do tampão fosfato com agitação em extrator do tipo mecânico durante 20 min, pois os resultados obtidos situam-se no centro da superfície.

Tais resultados sugerem que o aumento ou diminuição de qualquer fator irá afetar negativamente a variável resposta. Machado *et al.* (2002) também obtiveram os melhores resultados de extração com a utilização de tampão fosfato com pH 7,4 e agitação durante 20 min, porém utilizaram shaker como mecanismo de extração.

3.3.3 Tempo de acidificação

O protocolo de análise de GA₃ por espectrofotometria de UV já está bem definido (Holbrook *et al.*, 1961), portanto neste trabalho foi determinado apenas o tempo disponível para a análise das amostras.

O método espectrofotométrico utilizado na análise de GA₃ é baseado na sua conversão em ácido giberelênico (figura 12) pela ação de ácidos fortes e a medida de sua absorbância a 254 nm.

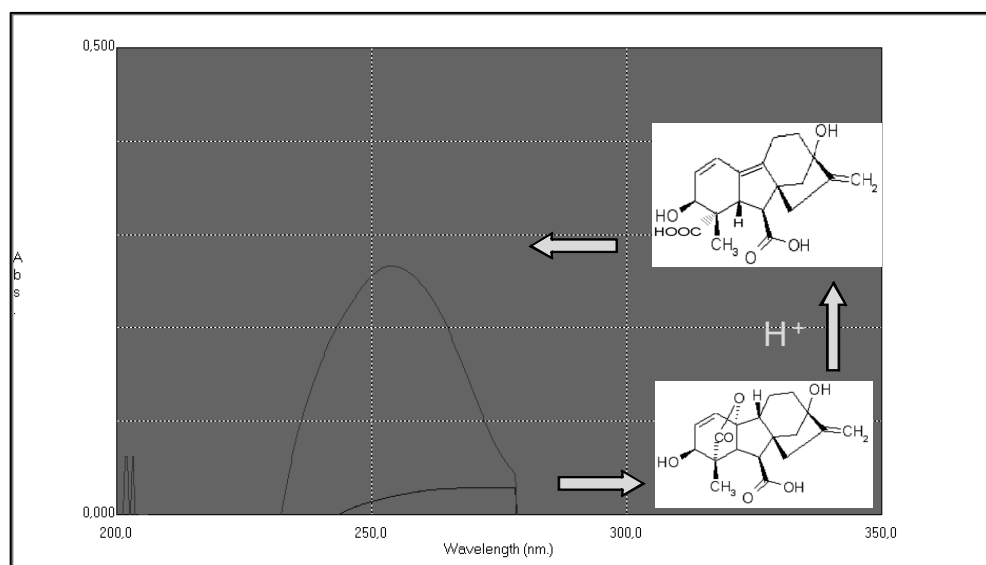


Figura 12 - Espectro da transformação de ácido giberélico em ácido giberelênico por acidificação

Fonte: A autora

O tempo de acidificação, descrito em literatura como 75 min (Holbrook *et al.*, 1961) foi estudado de forma a definir um intervalo de tempo disponível para a análise por espectrofotometria. Tal preocupação decorre do fato de o número de amostras ser elevado exigindo mais tempo disponível para análise. Os resultados são apresentados na Figura 13.

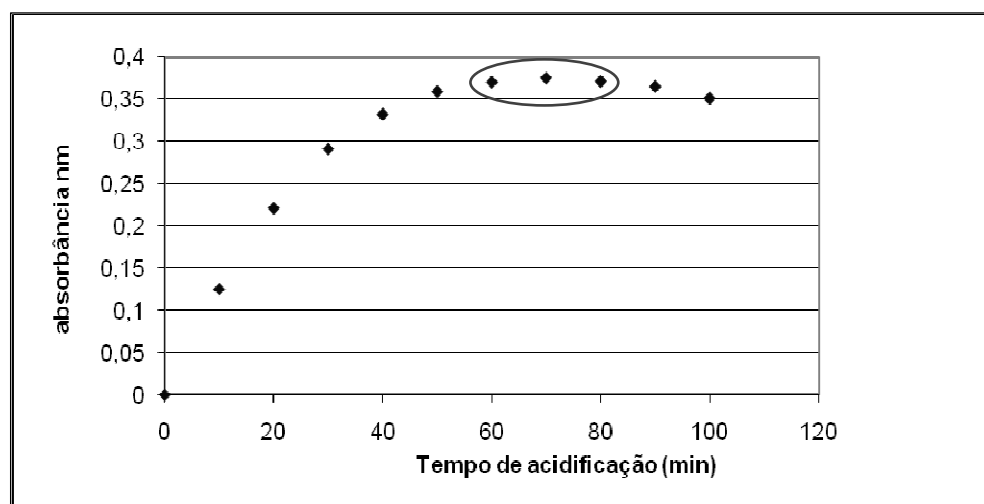


Figura 13 – Estudo do tempo de acidificação na transformação de ácido giberélico em ácido giberelênico

Os valores de absorbância máximos, encontram-se no intervalo de 60 a 80 min de acidificação. Portanto, é possível realizar análises da amostra em até 20 min após os primeiros 60 min de acidificação.

4. CONCLUSÕES

A polpa cítrica e *F. moniliforme* LPB 03 foram selecionados como substrato/suporte e cepa produtora, respectivamente, para a produção de GA₃ por FES com uma produção de 5,66±0,108 g de GA₃/kg da PC em 7 dias de fermentação.

Com a caracterização das propriedades físico-químicas da PC pode se observar que este resíduo apresenta quantidades significativas de açúcares,

nitrogênio e sais minerais em proporções adequadas ao crescimento do microrganismo e acúmulo de GA₃ por FES.

As condições de extração foram definidas com uma proporção 1:3 de material fermentado e volume de tampão fosfato, pH 7,4 e 20 min de agitação em extrator do tipo mecânico. Também foi possível definir 20 min de intervalo para que se possa realizar a análise de quantificação de GA₃ por espectrofotometria a 254 nm após 60 min de acidificação da amostra.

5. REFERÊNCIAS

Abecitrus – Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html>>. Acessado em 28 mar. 2006.

Abaissa - Disponível em: <http://www.abaiissa.com.br/polpacitrica>. Acessado em 24/06/2008

Castro L.B.N., Oliveira L.A., Moreira R.F. Murta R.M. Bagaço de cana para alimentação de ruminantes. *Pub vet.* 2008; artigo 432, n 30 ed 41.

Corona A., Sanchez D., Agostin E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochemistry.* 2005; 40:2655-58.

Escamilla E.M, Dendooven L., Magaña I.P., Parra R., De La Torre M. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *Journal of Biotechnology.* 2000; 76, 147-155.

Gelmi C., Pérez-Correa R., González M., Agosin E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochemistry.* 2000; 35:1227-33.

Holbrook A., Edge W., Bailey F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Adv Chem Ser.* 1961; 28, 159-167.

IMCOPA – Disponível em: <http://www.imcopa.com.br/abertura-800.htm>. Acessado em: 05 mar. de 2007.

Kagawa, A. ed. Standard table of food composition in Japan. Tokyo: University of Nutrition for women. 1995; 104-105.

Kumar P.K.R, Lonsane B.K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*. 1989; 34:29-139.

Machado C.M.M., Oliveira B.H., Pandey A., Soccol C.R. *Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation*. In: Book on Coffee Biotechnology and Quality, Sera T, Soccol CR, Pandey A and Roussos S (eds), Kluwer Academic Publishers, Dorcrecht; 2001; 401- 408.

Machado C.M.M., Soccol C.R. and Pandey A.,. Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002; 102, 179-192.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2005 – Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 1944; 153, 375-380.

POLI-NUTRI – Disponível em:
http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_janeiro.htm Acessado em: 06 de mar. 2007.

Rodrigues, C., 2006. *Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Polpa Cítrica*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil.

SES - Secretaria de Estado da Saúde. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1985; 523.

Shukla R., Chand S., Srivastava A.K. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36:492-7.

Somogyi, M. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*. 1945; 160, 61-68.

Souza, A. L.; Garcia, R.; Pereira, O. G.; Cecon, P. R.; Valadares Filho, S. C.; Paulino, M. F. Composição Químico-Bromatológica da Casca de Café Tratada com Amônia Anidra e Sulfeto de Sódio. *Rev. Bras. Zootec.* 2001; 30(3): 983-991.

União Farelos – disponível em www.uniãofarelos.com.br/. Acessado em 10 de Abril de 2010.

Vandenberghe, L.P.S; Soccol, C. R; Pandey, A.; Lebeault, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 2000, 74, n. 2, 175-178.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GA₃ POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO POLPA CÍTRICA COMO SUBSTRATO/SUPORTE

RESUMO

A produção de inóculo para crescimento da cepa de *F. moniliforme* LPB 03 foi realizada utilizando diferentes metodologias. Os meios foram testados com relação a viabilidade celular e produção de GA₃ em FES utilizando PC como substrato/suporte. Os ensaios fermentativos conduzidos com os inóculos produzidos de diferentes maneiras ocorreram em frascos de Erlenmeyer a 29 °C, com umidade inicial de 75% e taxa de inoculação de 10-20% (v/m) por 7 dias. O melhor meio de produção de inóculo foi o extrato de PC adicionado de sacarose, onde a produção alcançou 5,71 g de GA₃/kg de PC seca em 7 dias. Esta produção foi semelhante à obtida com a utilização do meio comercial Czapek. Em seguida, a estratégia de planejamento experimental foi utilizada na otimização das variáveis físico-químicas do processo de produção de GA₃ em frascos de Erlenmeyer de 250 ml. Primeiramente, as variáveis analisadas foram: pH, umidade inicial, taxa de inóculo, temperatura e granulometria da PC. Posteriormente, foi estudada a adição de fonte de carbono, nitrogênio e sais de magnésio (MgSO₄.7H₂O), cobre (CuSO₄.5H₂O), potássio (KH₂PO₄), ferro (FeSO₄) e zinco (Zn₂SO₄.7H₂O) ao meio de produção. Após a otimização foi estabelecida a umidade inicial de 75% obtida com a adição de uma solução contendo magnésio e uréia, taxa de inoculação de 10% (v/m), com a fermentação ocorrendo a 28-29 °C. Estas condições foram empregadas em um estudo de cinética de produção de GA₃ durante 7 dias. A maior produção foi observada no sexto dia (7,6 g de GA₃/kg de PC seca) representando um aumento de 33,3% na produção. Utilizando-se os parâmetros físico-químicos estabelecidos para fermentação em frascos de Erlenmeyer realizou-se um estudo da influência da aeração no processo em biorreatores do tipo coluna. As variáveis estudadas foram: aeração (15 - 90 mL/min) e umidade inicial (60 - 80%). Foi estabelecida umidade inicial de 70% e aeração de 30 mL/min. Estas condições foram utilizadas em um estudo cinético de 7 dias acompanhado de avaliação respirométrica microbiana onde o consumo de O₂ e produção de CO₂ foram avaliados. A maior produção foi observada no quinto dia obtendo-se 7,3 g de GA₃/kg de PC seca. Isso representa um aumento de produtividade de 15,26 % com relação ao obtido em frascos de Erlenmeyer nos quais ocorre aeração por difusão.

Palavras-chave: otimização de variáveis, aeração

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um processo biotecnológico passa por diferentes etapas importantes. Uma delas é a produção de inóculo, que geralmente envolve o estudo de viabilidade de células, a otimização da composição do meio e do melhoramento genético da cepa. Alguns detalhes do meio utilizado para a reprodução celular (produção de inóculo) às vezes não são realmente verificadas. No entanto, um ganho significativo na produtividade pode ser alcançado com estes procedimentos.

Cada um dos aspectos físico-químicos da fermentação também afeta significativamente a produção de GA₃ e devem ser estudados como forma de otimizar a fermentação e, conseqüentemente, aumentar a produção de GA₃.

A forma como o pH, a umidade, a_w , temperatura, aeração e taxa de inoculação afetam o desenvolvimento da produção e o acúmulo de GA₃ no meio fermentativo, têm sido alvo de diferentes estudos (Escamilla *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2002; Shukla *et al.*, 2005). Também os fatores diretamente relacionados à nutrição do microrganismo e indução na produção de GA₃ são importantes uma vez que o bom desenvolvimento do microrganismo é um fator relevante em qualquer processo fermentativo.

Embora estes aspectos da fermentação já tenham sido bastante estudados, o que se observa é que os resultados de produção dependem também principalmente, do microrganismo e do substrato/suporte escolhidos.

Desta forma esta etapa do trabalho teve por objetivos desenvolver um meio de produção de inóculo que fosse reprodutível e possibilitasse uma maior produção de GA₃. Estudos de otimização das variáveis físico-químicas do processo de produção de GA₃ por FES, utilizando o fungo *F. moniliforme* e PC como substrato/suporte e acompanhamento do metabolismo do microrganismo, através de estudo cinético de produção de GA₃, foram realizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento do Meio de Produção de Inóculo

O micélio de *F. moniliforme* LPB 03 foram produzidos em tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado, incubado a 30 °C por 7 dias. Este foi raspado com auxílio de uma alça de platina e inoculados em frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo o meio de produção.

Diferentes modos de produção de inóculo (produção de pellets com posterior crescimento em caldo Czapek, meio BDA, caldo Czapek e extrato de PC) foram estudados com relação à viabilidade das células da cepa selecionada e utilização na produção de GA₃ por FES conforme mostra a Figura 14. Todos os meios foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min e resfriados antes de serem inoculados.

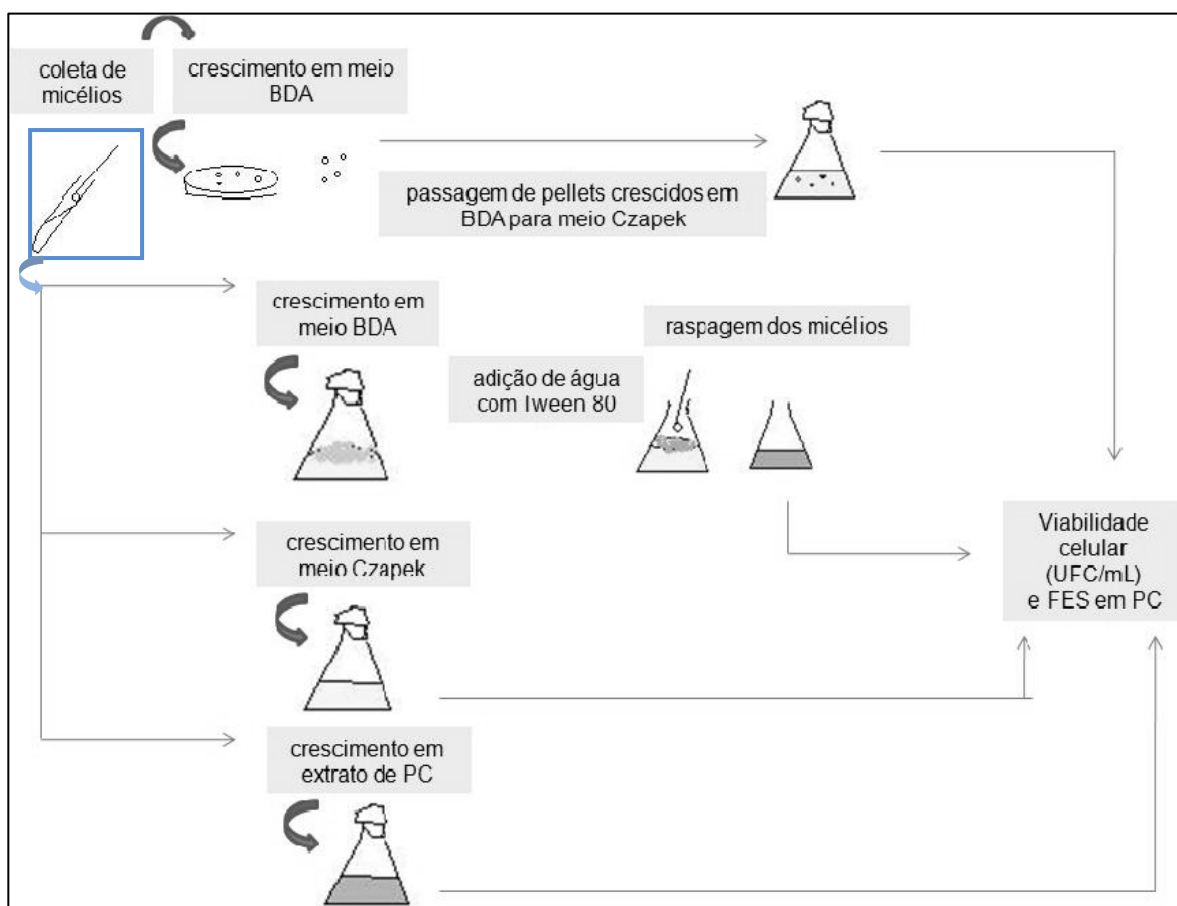


Figura 14 – Esquema do estudo de diferentes meios de produção de inóculo de *F. moniliforme* LPB 03

Os diferentes modos de produção de inóculo estudados estão descritos a seguir:

Meio BDA

Os micélios da cepa *F. moniliforme* LPB 03 foram produzidos em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio BDA, onde a cepa foi repicada e incubada a 30 °C por 7 dias. A suspensão de micélios foi obtida através de raspagem da superfície deste meio utilizando 30 mL de solução aquosa contendo Tween 80 (0,01%).

Produção de Pellets com posterior crescimento em caldo Czapek

O micélio da cepa *F. moniliforme* LPB 03 foi produzido em placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA e incubados a 30 °C por 7 dias. Cinco discos de 6 mm de diâmetro desta cultura em meio sólido, foram inoculados em frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de caldo Czapek. A suspensão de micélios foi obtida após incubação a 30 °C e agitação de 120 rpm por 7 dias.

Meio caldo Czapek

O micélio da cepa *F. moniliforme* LPB 03 foi produzido em tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado, incubado a 30 °C por 7 dias. Os micélios assim produzidos foram raspados com auxílio de uma alça de platina e inoculados em frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio caldo Czapek. A suspensão de micélios foi obtida após incubação a 30 °C e agitação de 120 rpm por 7 dias.

Extrato de PC

O extrato de PC foi produzido utilizando 5 g de PC (previamente seca e moída em moinho de disco de forma a se obter granulometria menor que 5 mm),

às quais foram adicionados 50 mL de água. A suspensão foi levada a ebulição por 30 min em banho-maria e, após resfriamento, foi filtrada.

Os micélios da cepa *F. moniliforme* LPB 03 foram produzidos em tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado e incubado a 30 °C por 7 dias. Estes foram raspados com auxílio de uma alça de platina e inoculados em frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de extrato de PC diluído em água (1:10). A suspensão de micélios foi obtida após incubação a 30 °C e agitação de 120 rpm por 7 dias.

2.2 Viabilidade Celular

A cepa selecionada foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo o meio em estudo. As amostras foram retiradas a cada 24 h. 100 µl da suspensão de micélio (produzida conforme item 2.1), foi transferido para placa de Petri contendo meio BDA, em triplicata. Em cada amostra foi realizada a contagem do número de colônias desenvolvidas nas placas. Sucessivas diluições da suspensão de micélios foram realizadas de forma a se obter contagens de 30 a 300 colônias por placa. Para o cálculo do número de células viáveis, multiplicou-se a média aritmética das placas pelo fator de diluição considerado, deixando o resultado em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) /mL de suspensão de micélios.

2.2.1 Testes com Inóculo Produzido em Extrato de PC

Os componentes do meio Czapek (30 g/L de sacarose, 3 g/L de NaNO₃, 1 g/L K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,5 g/L KCl e 0,01 g/L FeSO₄) foram adicionados ao extrato de PC de acordo com um delineamento experimental do tipo fatorial incompleto de 2⁶⁻³, com 1 ponto central em duplicata, totalizando 18 ensaios. A presença e a ausência de cada componente foram então analisados com relação a utilização do inóculo na produção de GA₃ por FES.

Posteriormente, diferentes concentrações de sacarose (30, 35 e 40 g/L) foram adicionadas ao extrato de PC sendo estes meios utilizados para produção de inóculo de *F. moniliforme* LPB 03. Estes foram estudados quanto a viabilidade celular e utilização em FES para a produção de GA₃.

2.3 FES durante a Seleção de Meio de Produção do Inoculo

A PC foi inicialmente seca e então triturada em moinho de discos a uma granulometria menor do que 5 mm. Foi utilizado então 10 g desse substrato/suporte em cada frasco de Erlenmeyer de 250 mL.

A PC foi impregnada com uma solução contendo FeSO₄.7H₂O (0,3 g/L) e (NH₄)₂SO₄ (0,1 g/L), de forma a ajustar a umidade inicial em 75%. Esta solução foi estabelecida em trabalhos anteriores (Machado *et al.*, 2002). O pH foi ajustado entre 5,0 – 5,5 e este meio foi inoculado (10% - 20% v/m). Após homogeneização, o meio foi incubado por até 7 dias a 30 °C.

2.4 Planejamentos Experimentais

Os planejamentos experimentais e análises dos resultados foram realizados utilizando o software STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

2.4.1 Otimização das Variáveis Físico-Químicas de Produção de GA₃

A primeira etapa desta otimização envolveu dois planejamentos experimentais sucessivos.

O primeiro planejamento experimental foi do tipo Plackett & Burman (PB) com 5 variáveis, 12 ensaios e mais três repetições do ponto central envolvendo as variáveis: pH (5,0, 5,5 e 6,0), umidade inicial do substrato/suporte (65, 75 e 80 %), temperatura (28, 30 e 32 °C), taxa de inoculação (10, 15 e 20 % v/m), e granulometria da PC (menor que 0,8 mm, entre 0,8 e 2 mm e entre 2 e 5 mm). Os níveis utilizados para cada variável foram estabelecidos de acordo com a

literatura. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com aeração por difusão. Os níveis das variáveis estudadas encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Planejamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central para as variáveis: pH, umidade, temperatura, taxa de inoculação e granulometria

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Taxa de inoculação</i>	<i>granulometria</i>
1	+1	-1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	+1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

O segundo planejamento experimental utilizado nesta etapa foi do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR para 2 variáveis (2^2 com 4 pontos axiais e 3 repetições de ponto central) (Tabela 21) e envolveu o estudo da umidade inicial 70,77 % (-1.42), 72 % (-1), 75 % (0), 78 % (+1) e 79,23 % (+1.42) e da granulometria da PC: menor que 0.8 mm (-1.42), entre 0,8 e 2 mm (-1), menor que 5 mm (0), entre 2 e 5 mm (+1) e maior que 5 mm (+1.42). As condições de fermentação utilizadas foram as descritas anteriormente com as alterações referentes aos resultados obtidos no primeiro planejamento desta etapa.

Tabela 21 – Planejamento experimental do tipo DCCR para as variáveis umidade e granulometria (2^2 + 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central)

<i>Ensaio</i>	<i>Umidade</i>	<i>Granulometria</i>
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5 (axial)	-1,42	0
6 (axial)	+1,42	0
7 (axial)	0	-1,42
8 (axial)	0	+1,42
9	0	0
10	0	0
11	0	0

2.4.2 Otimização da Composição da Solução Nutritiva

Esta etapa envolveu a otimização das variáveis diretamente relacionadas à adição complementar de fontes nutricionais a PC utilizada como substrato/suporte para produção de GA₃ em FES. As fermentações foram realizadas durante 6 dias nas condições otimizadas na otimização das variáveis físico-químicas.

Primeiramente foram estudadas individualmente (*one factor at a time*) as fontes complementares de nitrogênio e de carbono. As fontes testadas de nitrogênio foram: NH₄NO₃ (0,24 – 1,65 g/L), NH₄Cl (0,98 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0,75 g/L) e uréia (0,75 g/L). As fontes estudadas de carbono foram: sacarose (40 g/L), glicose (80 g/L) e amido (40, 80 e 120 g/L), sendo que as concentrações utilizadas foram escolhidas com base na literatura, respeitando-se as respectivas massas molares.

Em seguida, foi realizado um estudo da composição da solução nutritiva que incluiu as fontes de nitrogênio e carbono que apresentaram os melhores

resultados na produção de GA₃. A estratégia de planejamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB) com 6 variáveis, 12 ensaios e 3 repetições no ponto central (Tabela 22) foi utilizada neste estudo. As variáveis estudadas foram: MgSO₄.7H₂O (0.75 – 1.5 g/L), KH₂PO₄ (3.0 – 5.0 g/L), Zn₂SO₄.7H₂O (0.07 – 0.3 g/L), CuSO₄.5H₂O (0.03 – 0.3 g/L), uréia (0,75 – 1,0 g/L) e amido (40 – 80 g/L).

Tabela 22 – Primeiro planejamento experimental para a solução nutritiva: tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central para 6 variáveis

<i>Ensaio</i>	<i>MgSO₄</i>	<i>KH₂PO₄</i>	<i>Zn₂SO₄</i>	<i>CuSO₄</i>	<i>Uréia</i>	<i>Amido</i>
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0

O segundo planejamento experimental utilizado nesta etapa foi do tipo DCCR e envolveu o estudo das variáveis MgSO₄.7H₂O e uréia ambos nos níveis: 0,795 g/L (-1,42), 1 g/L (-1), 1,5 g/L (0), 2 g/L (+1) e 2,2 g/L (+1,42) conforme apresentado na Tabela 23. Estas variáveis foram consideradas significativas na etapa anterior desta otimização.

Tabela 23 – Segundo planejamento experimental para a solução nutritiva: tipo DCCR para 2 variáveis (2^2 + 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central)

<i>Ensaio</i>	<i>MgSO₄</i>	<i>Uréia</i>
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5 (axial)	-1,42	0
6 (axial)	+1,42	0
7 (axial)	0	-1,42
8 (axial)	0	+1,42
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Após a otimização foi realizado um estudo da cinética de produção do GA₃ num período de até 7 dias, onde amostras foram analisados a cada 24 h de fermentação:

- pH do meio fermentado, umidade final, a_w e açúcares totais e redutores: conforme descrito no item 2.4 do Capítulo I;
- produção de GA₃: a extração e análise do GA₃ produzido foi realizada conforme otimizado no Capítulo I;
- biomassa: utilizou-se a metodologia de dosagem do ergosterol presente na membrana do fungo o qual foi extraído em hexano sendo analisado por HPLC (Carvalho *et al.*, 2006).

2.5 Produção de GA₃ em Biorreatores do Tipo Coluna Com Aeração Forçada

O sistema utilizado nesta etapa é constituído de colunas de vidro que contêm o material a ser fermentado. Estas colunas são conectadas em borbulhadores de ar de 250 mL, contendo aproximadamente 150 mL de água

destilada, para umedecer o ar antes de sua passagem pelo incubador. As colunas são introduzidas em uma cuba de vidro que contem água mantida a 28 °C com auxílio de aquecedor e controlada por um termostato. Cada coluna é acoplada a uma válvula que permite ajustar a vazão de ar controlado através de um rotômetro na saída de ar da coluna (Figura 15).

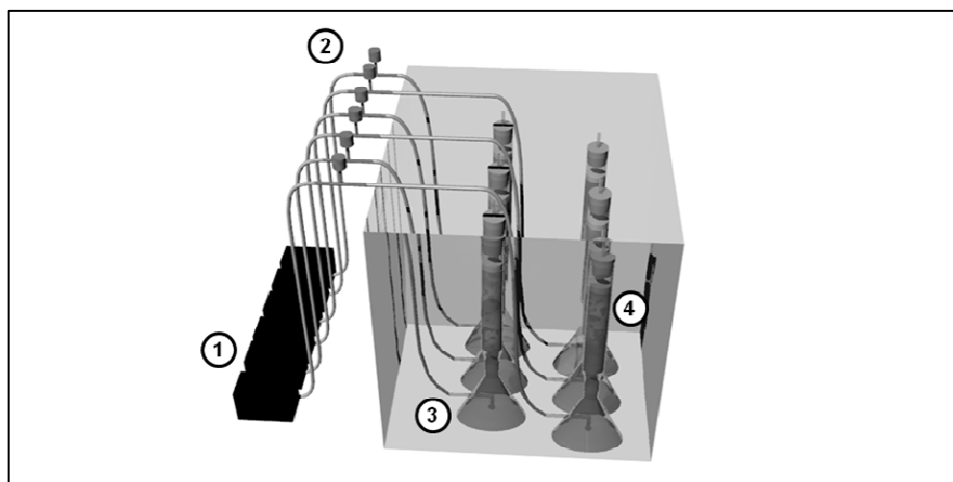


Figura 15 - FES em colunas de vidro: 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4) colunas imersas em banho de água com controle de temperatura

As colunas de vidro (4 cm de diâmetro e 20 cm de altura), bem como os borbulhadores de ar foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Utilizou-se 35 g de substrato úmido (solução nutritiva contendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e uréia a 1,5 g/L), o qual foi esterilizado separadamente em frascos de vidro. A inoculação foi realizada no próprio frasco e após homogeneização, as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. A aeração foi ajustada em 30 a 90 mL/min.

O primeiro planejamento aplicado para os estudos neste sistema foi do tipo fatorial completo: 2^2 com 3 repetições no ponto central onde foram estudadas as variáveis umidade inicial e aeração. Os níveis estudados para umidade foram 70% (-1), 75% (0) e 80% (+1), e para aeração foram 30 mL/min (-1), 60 mL/min (0) e 90 mL/min (+1), conforme Tabela 24.

Tabela 24 – Planejamento experimental do tipo 2² com 3 repetições no ponto central para colunas com aeração forçada

<i>Ensaio</i>	<i>Umidade</i>	<i>Aeração</i>
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Em seguida, foi realizada uma otimização com novos valores de umidade e aeração utilizando o mesmo planejamento experimental (fatorial completo de 2 variáveis e 2 níveis) apresentado na Tabela 24. Sendo que os novos valores foram para umidade: 60% (-1), 65% (0) e 70% (+1) e para aeração: 15 mL/min (-1), 30 mL/min (0) e 60 mL/min(+1).

Após a otimização das condições, foi realizado um estudo cinético da produção de GA₃ durante 7 dias onde o consumo de O₂ e produção de CO₂, foram medidos continuamente através da análise dos gases. Também foram analisados o pH, umidade final, açúcares consumidos, biomassa produzida e a_w a cada 24 h de fermentação (conforme descrito no item 2.5 Capítulo I). A extração e análise foram realizadas tomando-se 30 g do material fermentado e procedendo como descrito no Capítulo I.

As análises de consumo de O₂ e produção de CO₂ foram realizadas com auxílio de sensores conectados ao sistema de fermentação em colunas e a um computador que realizou a coleta de dados utilizando o Software Fersol II, desenvolvido no Laboratório de Processos Biotecnológicos (Figura 16). Para realizar a aquisição de dados, os parâmetros de fermentação foram monitorados e controlados por um computador pessoal, em tempo real, concebido sob plataforma LAquis (LCDS, Brasil). Os parâmetros de O₂ e CO₂ são monitorados na entrada e saída da coluna e foram medidos com um sensor de oxigênio (O₂-sensor modelo

A2 Alphasense Ltd. do Reino Unido) e sensor de CO₂ (sensor Vaisala modelo GMT220 Carbocap. Finlândia).

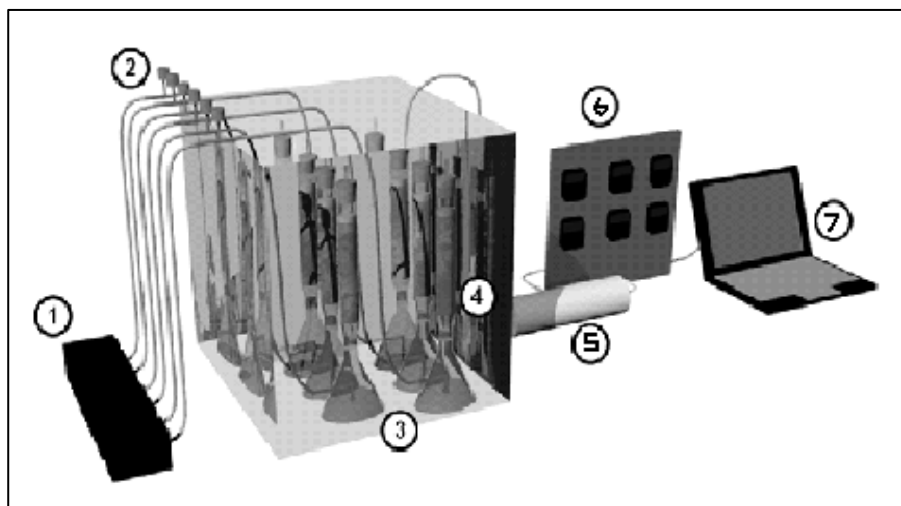


Figura 16 - FES em colunas de vidro com análise de O₂ e CO₂: 1) bomba de ar; 2) sistema de distribuição de ar; 3) umidificadores; 4) colunas imersas em banho de água com controle de temperatura; 5) estrutura contendo os sensores; 6) painel de controle; 7) computador para aquisição de dados e controle do software

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do Meio de Produção de Inóculo

Nesta etapa foram realizados testes de modo a escolher o melhor meio para produção de inóculo utilizando a cepa selecionada *F. moniliforme* LPB 03. Primeiramente foi realizado um estudo cinético de crescimento da cepa em todos os meios estudados de forma a identificar em qual deles a cepa se desenvolve mais rapidamente, ou seja, com o maior número de UFC/mL no menor tempo de incubação. A Tabela 25 mostra a cinética de viabilidade desta cepa cultivada em diferentes meios de produção de inóculo.

Tabela 25 - Contagem de células viáveis no inoculo produzido utilizando diferentes metodologias e meios de cultivo

<i>Tempo de crescimento (h)</i>	<i>MC*</i>	<i>MBDA*</i>	<i>MEPC*</i>	<i>PMC*</i>
24	2,19x10 ⁶	8,00x10 ³	3,35x10 ⁵	1,90x10 ⁶
48	1,53x10 ⁸	2,80x10 ⁵	1,39x10 ⁶	7,00x10 ⁷
72	2,30x10 ⁸	1,05x10 ⁶	1,35x10 ⁷	4,00x10 ⁷
96	1,90x10 ⁸	1,10x10 ⁷	2,10x10 ⁸	1,16x10 ⁸
120	3,60x10 ⁸	1,80x10 ⁷	1,21x10 ⁷	1,07x10 ⁸
144	3,90x10 ⁸	3,00x10 ⁶	2,80x10 ⁶	2,60x10 ⁸
168	1,10x10 ⁹	1,10x10 ⁶	1,00x10 ⁶	6,00x10 ⁷
192	1,68x10 ⁹	---	---	---
216	2,40x10 ⁹	---	---	---
240	1,10x10 ⁸	---	---	---

* MC = Meio caldo Czapek; MBDA = Meio BDA; MEPC = Meio de extrato de PC e PMC = Produção de pellets com posterior crescimento em meio caldo de Czapek

Os estudos foram realizados em cada meio até que fosse observada a queda do número de UFC/mL, a qual representa o início do período de morte das células. Para o meio caldo Czapek somente a partir de 216 h de incubação houve uma queda no número de UFC/mL sendo que o máximo foi de $1,1 \times 10^9$ UFC/mL observado em 168 h.

A contagem de células chegou a $2,1 \times 10^8$ UFC/mL em 96 h usando meio de extrato de PC e pellets, sendo o meio que apresentou o menor crescimento da cepa *F. moniliforme* LPB 03 o meio BDA, com o máximo de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL após 96 h de incubação.

Desta forma foi determinado o melhor tempo de produção de inóculo como sendo para o meio Czapek 168 h e 96 h para os meios BDA, pellets e extrato de PC.

Cada meio foi testado no que diz respeito à produção de GA₃ por FES utilizando PC como substrato. A produção de GA₃ foi determinada nos 4º e 7º dias usando 10, 15 e 20% (v / m) de inóculo.

Bons resultados de produção de GA₃ foram atingidos com a utilização de todos os meios de produção de inóculo. Os melhores resultados foram obtidos com 15% (v / m) do inóculo cultivado em meio Czapek (5,6 g / kg de PC) no 7º dia de fermentação (Tabela 26).

Tabela 26 - Produção de GA₃ (g/kg de PC seca) em FES utilizando diferentes meios de crescimento do inóculo

<u><i>Inóculo</i></u>	<u><i>4º dia de fermentação</i></u>			<u><i>7º dia de fermentação</i></u>		
<i>(taxa de inóculo)</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>
Meio Czapek	2.42	5.30	3.50	3.10	5,60	4.67
Meio BDA	2.40	1.86	1.13	3.97	3.00	3.84
Produção de pellets com posterior crescimento em meio Czapek	3.10	2.92	3.19	3.37	2.13	1.7
Extrato de PC	0.83	1.77	3.01	2.14	1.46	1.66

As metodologias de formação de pellets, com subsequente crescimento em meio de Czapek, e o meio BDA, demonstraram bons resultados com uma taxa de inóculo de 10% (3,10 g de GA₃ / kg de PC e 2,40 g de GA₃/ kg de PC, respectivamente), embora estas duas metodologias não possam ser economicamente justificadas em escala industrial, pois tanto o meio BDA quanto Czapek têm custo elevado.

O inóculo cultivado no extrato de PC, embora menos rico em nutrientes, também mostrou bons resultados no 4º dia de fermentação (3,01 g GA₃ / kg de PC). No entanto, 20% de taxa de inóculo foi usado neste caso, o que poderia ser visto como um fator limitante para a sua aplicação industrial.

Desde que um dos objetivos deste trabalho é a utilização de resíduos agro-industriais e/ou subprodutos, alguns testes complementares foram realizados com extrato de PC. Ao extrato foram adicionados os componentes do meio caldo Czapek já que este apresentou os melhores resultados de crescimento de inóculo e na produção de GA₃. Com os resultados foi obtido um diagrama de Pareto (R² = 0,705) que é apresentado na Figura 17.

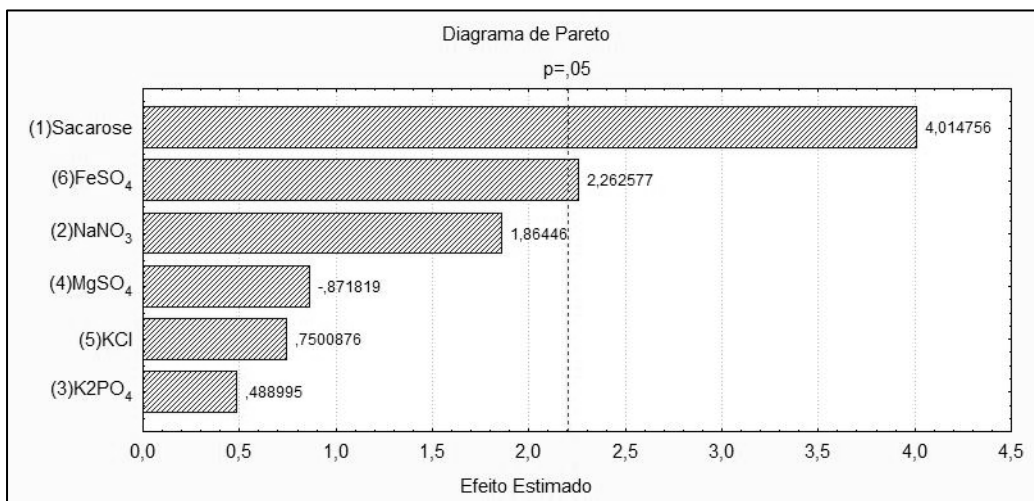


Figura 17 - Diagrama de Pareto dos efeitos da adição de componentes do caldo Czapek no meio de extrato de PC

Observa-se que a sacarose foi o componente mais significativo ao nível de 95% ($p < 0,05$), o que justificou novos estudos para definir a concentração ideal de sacarose a ser adicionada ao extrato de PC.

Três concentrações de sacarose (30, 35 e 40 g/L) foram utilizadas, sendo que os extratos assim produzidos foram primeiramente analisados quanto a cinética de produção de inóculo com os resultados obtidos em UFC/mL (Figura 18).

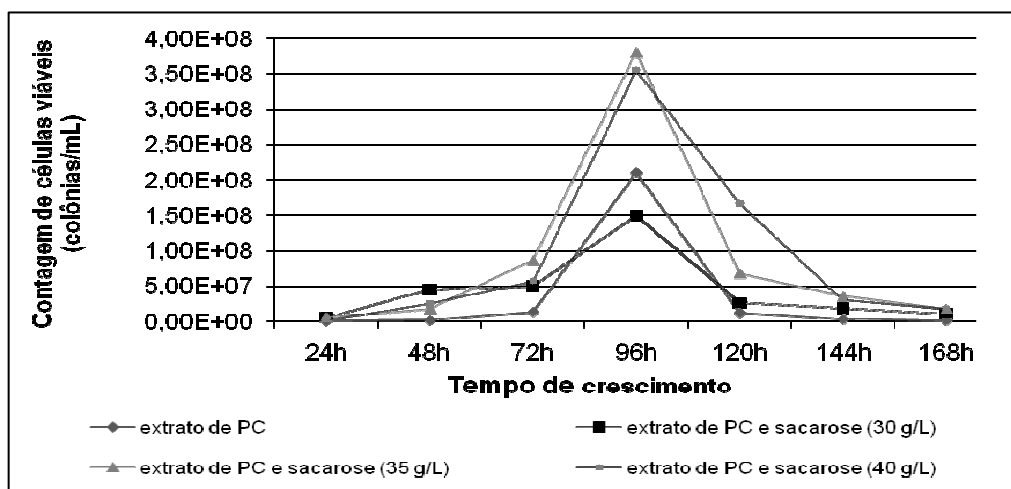


Figura 18 - Viabilidade celular do inoculo produzido em extrato de PC adicionado de sacarose

Concentrações mais elevadas de células (10^8 UFC/mL) foram obtidas em 4 dias com todos os extratos de PC estudados. Quando utilizados estes inóculos em FES foi observado uma maior produção de GA_3 (4,7 g/kg de PC seca) com o inoculo produzido em extrato de PC adicionado de 35 g/L de sacarose (Tabela 27).

Tabela 27 - Produção de GA_3 com a utilização de diferentes concentrações de sacarose adicionado ao extrato de PC, utilizado como meio de produção de inoculo

<i>Inoculo</i> <i>(taxa de inoculo)</i>	<i>4º dia de fermentação</i>			<i>7º dia de fermentação</i>		
	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>
Extrato de PC	0,83	1,77	3,01	2,14	1,46	1,66
Extrato de PC e sacarose (30g/L)	3,84	3,24	3,92	3,23	3,10	3,59
Extrato de PC e sacarose (35g/L)	3,80	4,75	4,13	4,28	4,70	4,16
Extrato de PC e sacarose (40g/L)	4,04	4,10	4,08	2,0	3,45	3,97

Sem a adição de sacarose ao extrato de PC, utilizado como meio de crescimento do inoculo, a maior produção alcançada foi de 3,01 g de GA_3 /kg de

PC seca utilizando 20% (v/m) do inóculo. Com a adição de sacarose ao extrato de PC, houve um aumento na produção. As maiores quantidades de GA₃ foram obtidas com 15% (v/m) do inóculo (4,75 g/kg de PC seca e 4,70 g/kg de PC seca respectivamente) o que representa um ganho econômico significativo no processo.

Desta forma, o inóculo produzido em extrato de PC adicionado de 35 g/l de sacarose foi selecionado. Sua estabilidade sob refrigeração a 4 °C, foi estudada. Observou-se uma diminuição exponencial da viabilidade somente após 5 dias de armazenamento (Figura 19), o que permite sua utilização por até 4 dias.

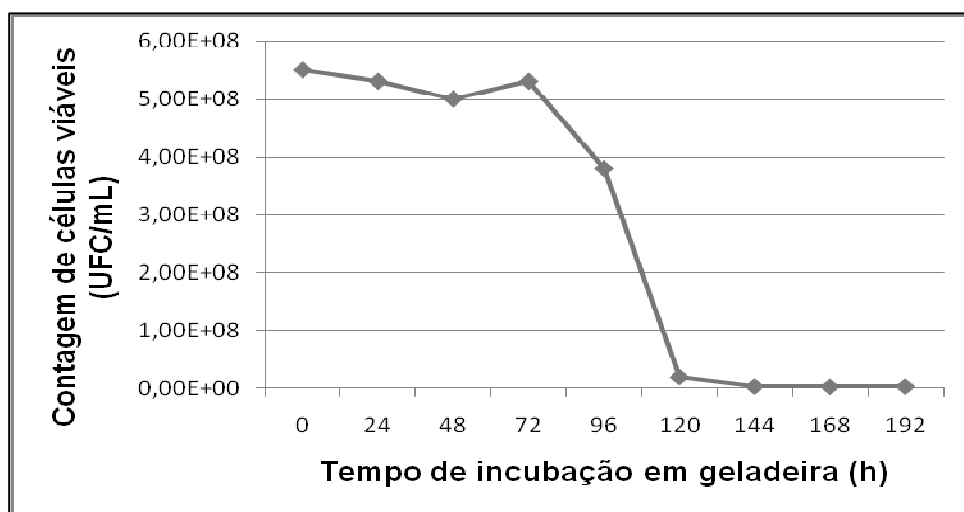


Figura 19 – Estudo da viabilidade do inóculo de *F. moniliforme* LPB 03 produzido utilizando extrato de PC, após estocagem sob refrigeração

Condições otimizadas para a produção do inóculo (15% v/m produzido em extrato de PC adicionado de 35 g/L de sacarose) foram empregadas em um estudo da cinética de produção de GA₃ com PC em FES por *F. moniliforme* LPB 03. A melhor produção foi alcançada no 6 ° dia de fermentação (5,71 g de GA₃/kg de PC) (Figura 20). Esta produção é comparável ao relatado em literatura onde o maior resultado observado para FES foi de 5g de GA₃/kg de matéria seca em trabalho realizado por Corona *et al.* (2005) utilizando farelo de trigo e amido como substratos.

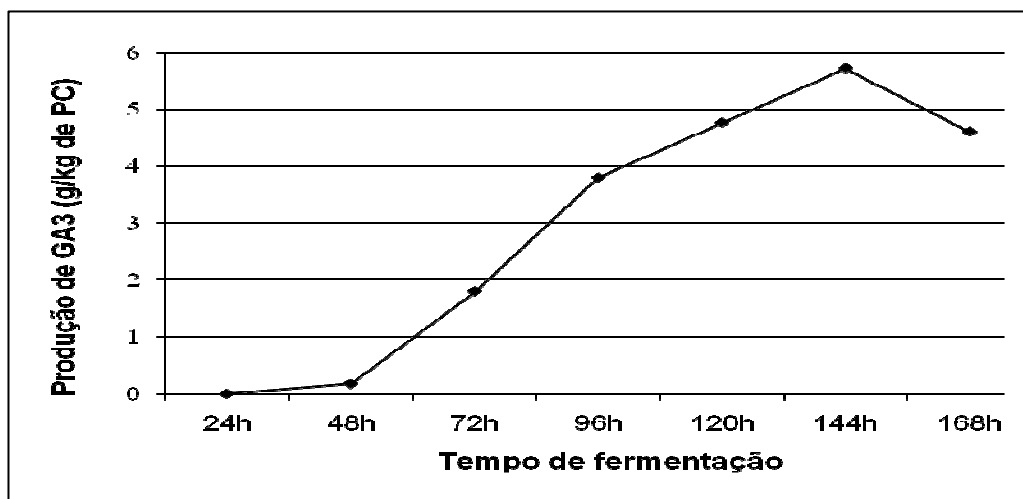


Figura 20 - Cinética de produção de GA₃ por FES utilizando PC como substrato/suporte e *F. moniliforme* LPB 03

Após esse estudo, a mesma produção de GA₃ obtida com caldo Czapek foi alcançada com extrato de PC suplementado com 35 g/L de sacarose. Além disso, o tempo de produção de inóculo foi diminuído em 72 h (de 168h com meio de caldo Czapek para 96h com extrato de PC), o que representa um ganho econômico representativo para o processo.

3.2 Otimização das Variáveis Físico-Químicas de Produção de GA₃

Os resultados da primeira etapa da otimização são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultados do planejamento experimental realizado na primeira etapa de otimização para as variáveis: pH, umidade, temperatura, taxa de inoculação e granulometria

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Taxa de inoculação (% v/m)</i>	<i>Granulometria (mm)</i>	<i>Produção (g GA₃/kg de PC)</i>
1	6,0	65	32	10	< 0,8	3,57
2	6,0	80	28	20	< 0,8	3,33
3	5,0	80	32	10	2 - 5	0,44
4	6,0	65	32	20	< 0,8	2,99
5	6,0	80	28	20	2 - 5	0
6	6,0	80	32	10	2 - 5	0
7	5,0	80	32	20	< 0,8	1,03
8	5,0	65	32	20	2 - 5	2,90
9	5,0	65	28	20	2 - 5	3,94
10	6,0	65	28	10	2 - 5	5,17
11	5,0	80	28	10	< 0,8	6,10
12	5,0	65	28	10	< 0,8	6,31
13	5,5	75	30	15	0,8 - 2	5,63
14	5,5	75	30	15	0,8 - 2	5,51
15	5,5	75	30	15	0,8 - 2	5,60

Analisando os resultados observa-se que as melhores condições de produção de GA₃ foram a utilização de PC com granulometria menor que 0,8 mm, 10% (v/m) de taxa de inóculo e temperatura de 28 °C para umidades de 80% e 65% (6,1 g/kg de PC seca e 6,31 g/kg de PC seca, respectivamente).

Com o auxílio de um diagrama do tipo Pareto (Figura 21) foi possível analisar a um nível de $p \leq 0,1$ os efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de GA₃.

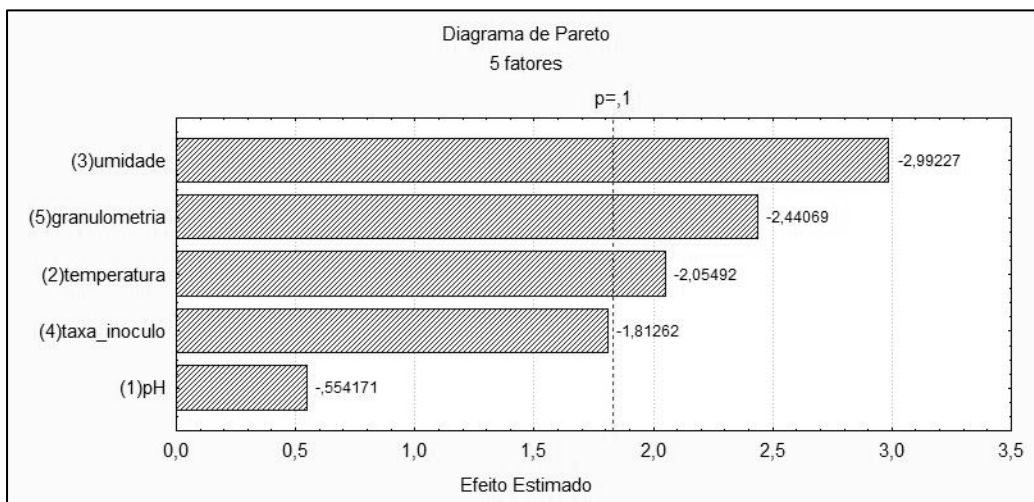


Figura 21 – Diagrama de Pareto originado dos resultados obtidos de produção de GA₃ na primeira etapa de otimização de 5 variáveis do processo fermentativo

As variáveis pH e taxa de inoculação não apresentaram significância dentro das faixas estudadas, o que representa menos gastos, principalmente pelo fato da quantidade de inóculo ser um dos fatores mais relevantes economicamente em um bioprocessamento em escala industrial. Desta forma, para a próxima etapa fixou-se o pH em 5,76 (natural da PC) e taxa de inoculação 10% v/m.

As variáveis que se apresentaram representativas a um nível de significância de 90% ($p \leq 0,1$), com R^2 de 0,72, foram: granulometria, umidade e temperatura. Como o diagrama mostra uma tendência de diminuição da temperatura e a menor temperatura estudada neste planejamento foi de 28 °C, optou-se, por motivos operacionais (menor temperatura utilizada nas estufas do laboratório), por fixar a próxima etapa de otimização em 28 °C.

Posteriormente, realizou-se um planejamento completo com as variáveis granulometria e umidade inicial. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Resultados do experimento do tipo DCCR utilizado na segunda etapa da otimização das variáveis granulometria e umidade inicial

<i>Ensaio</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Granulometria (mm)</i>	<i>Produção (g GA₃/kg de PC)</i>
1	72	0,8 – 2,0	2,64
2	72	2,0 – 5,0	0,92
3	78	0,8 – 2,0	2,01
4	78	2,0 – 5,0	4,64
5 (axial)	70,77	< 5,0	3,18
6 (axial)	79,23	< 5,0	3,58
7 (axial)	75	< 0,8	3,60
8 (axial)	75	> 5,0	2,58
9	75	< 5,0	6,14
10	75	< 5,0	6,21
11	75	< 5,0	6,06
12	75	< 5,0	6,29

O menor valor de produção de GA₃ (0,92 g/kg de PC seca) foi obtido com a menor umidade estudada (72%) e uma granulometria da PC entre 2,0 e 5,0 mm. Este valor de umidade embora propicie as trocas gasosas, não foi o suficiente para um bom crescimento da biomassa, além disso, a presença de partículas maiores pode evitar a compactação, mas também limita a superfície de contato do microrganismo com os nutrientes do substrato. A importância desta relação pode ser observada pelos valores obtidos de p na tabela de ANOVA (Tabela 30)

Tabela 30 – ANOVA da otimização das variáveis: umidade inicial e granulometria da PC

<i>Fator</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Médias Quadradas</i>	<i>Razão f</i>	<i>Razão p</i>
(1) Umidade (L)	1,684844	1	1,684844	4,172634	0,087118
Umidade (Q)	16,50711	1	16,50711	40,881	0,000689
(2) Granulometria (L)	0,035178	1	0,035178	0,087122	0,777816
Granulometria (Q)	19,64483	1	19,64483	48,65177	0,000432
1L com 2L	4,734976	1	4,734976	11,7265	0,014068

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

A única variável que individualmente não apresentou significância, mesmo a 90%, foi a granulometria linear. Mas, quando analisada a umidade quadrática e granulometria quadrática, pode-se perceber um nível de significância superior a 99% com valores de p menores que 0,01. Estes resultados confirmam a importância destas duas variáveis para o processo fermentativo de produção de GA₃.

A maior produção de GA₃ (6,2 g/kg de PC seca) neste experimento foi alcançada nas condições de ponto central (75% de umidade e PC apenas moída com granulometria menor que 5 mm). Este resultado foi confirmado com a geração da superfície de resposta obtida com R² de 0,94 (Figura 22).

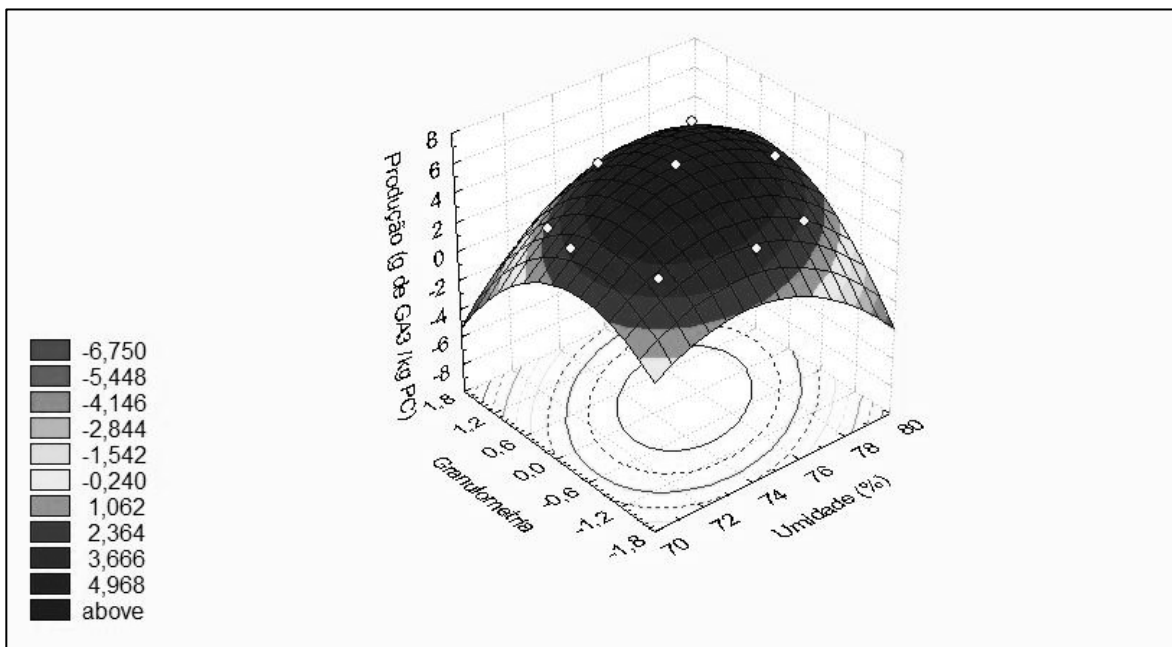


Figura 22 – Superfície de Resposta obtida com os resultados da otimização das variáveis: umidade inicial e granulometria da PC

A umidade de 75% não é muito elevada o que propicia as trocas gasosas e a difusão de nutrientes no meio de fermentação garantindo, assim, o crescimento suficiente de biomassa e produção de GA_3 .

Com relação às diferentes granulometrias da PC, os experimentos indicaram que a melhor granulometria empregada foi a obtida com a moagem dos grãos para obtenção de partículas menores que 5 mm sem peneiramento posterior. Nestas condições, onde a produção foi 6,175 g de GA_3 /kg de PC seca, observou-se que o meio de fermentação não apresentava muita compactação (devido a presença de partículas de maior tamanho) facilitando as trocas gasosas e ao mesmo tempo com boa superfície de contato (devido a presença de partículas de tamanho menor). Tal fato é economicamente vantajoso para o processo de produção do GA_3 por FES, uma vez que além de aumentar a produção, elimina uma operação (peneiramento) durante o processo.

Assim, os parâmetros do processo estabelecidos nesta primeira etapa foram: pH 5,76 (pH natural da PC), taxa de inoculação 10% (v/m), 75% de umidade inicial, PC apenas moída com granulometria menor que 5 mm e

temperatura de fermentação de 28 °C. Nestas condições se alcançou uma produção de 6,175 g de GA₃/kg de PC seca.

3.3. Otimização da Composição da Solução Nutritiva

Com os primeiros parâmetros estabelecidos, foram estudadas as variáveis diretamente relacionadas à suplementação de fontes nutricionais ao substrato/suporte para produção de GA₃.

A primeira etapa desta fase foi a escolha das fontes suplementares de nitrogênio e carbono, onde os resultados são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 – Resultados obtidos com os estudos da suplementação com fonte de nitrogênio e fonte de carbono

<i>Componente (N) 0,75 g/L</i>	<i>g de GA₃/kg de PC seca</i>	<i>Componente (C)</i>	<i>g de GA₃/kg de PC seca</i>
NH ₄ NO ₃	5,04±0,099	Glicose (80 g/L)	4,03±0,076
NH ₄ Cl	4,25±0,279	Sacarose (40 g/L)	2,75±0,120
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,52±0,075	Amido (80 g/L)	4,87±0,281
Uréia	5,37±0,221	Branco*	6,07±0,193

* Sem adição suplementar de fontes de nitrogênio ou carbono

Os melhores resultados foram obtidos com a uréia (0,75 g/L) como fonte suplementar de nitrogênio e amido (80 g/L) como fonte suplementar de carbono. Embora, em nenhuma condição de suplementação tenha se alcançado a produção de GA₃ obtida no ensaio sem adição de fontes suplementares. Uréia e amido foram selecionados para integrar a próxima etapa da otimização já que interações entre estas fontes e outros sais em diferentes níveis poderiam ser significativas.

A segunda etapa desta fase incluiu o estudo da adição de 4 sais à solução nutritiva, além de uréia e amido em diferentes níveis. O planejamento utilizado foi do tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central

para 6 variáveis. Os resultados de produção de GA₃ estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 – Resultados do primeiro planejamento experimental tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central para a otimização da composição da solução nutritiva

<i>Ensaio</i>	<i>MgSO₄</i> (g/L)	<i>KH₂PO₄</i> (g/L)	<i>ZnSO₄</i> (g/L)	<i>CuSO₄</i> (g/L)	<i>Uréia</i> (g/L)	<i>Amido</i> (g/L)	<i>Produção</i> (g GA ₃ /kg de PC)
1	1,5	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	5,10
2	1,5	5,0	0,0	0,3	0,0	0,0	4,98
3	0,0	5,0	0,3	0,0	1,0	0,0	2,70
4	1,5	0,0	0,3	0,3	0,0	80	2,01
5	1,5	5,0	0,0	0,3	1,0	0,0	4,03
6	1,5	5,0	0,3	0,0	1,0	80	3,27
7	0,0	5,0	0,3	0,3	0,0	80	0,26
8	0,0	0,0	0,3	0,3	1,0	0,0	4,56
9	0,0	0,0	0,0	0,3	1,0	80	1,72
10	1,5	0,0	0,0	0,0	1,0	80	1,81
11	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	80	1,31
12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,16
13	0,75	3,0	0,07	0,03	0,75	40	2,47
14	0,75	3,0	0,07	0,03	0,75	40	2,40
15	0,75	3,0	0,07	0,03	0,75	40	2,34

Analisando individualmente as variáveis estudadas, observa-se que com relação aos sais adicionados, apenas o MgSO₄ apresentou diferenças mais acentuadas de produção dependendo dos níveis estudados. Por outro lado, com relação ao amido a menor produção de GA₃ (0,26 g/kg de PC seca) foi obtida com a adição da maior concentração de amido (80 g/mL).

Nenhum dos resultados obtidos foi superior ao do ensaio sem suplementação (5,16 g de GA₃/kg de PC seca), porém faz-se necessário uma análise mais aprofundada dos efeitos das variáveis. Para este fim foi utilizado o diagrama de Pareto (Figura 23).

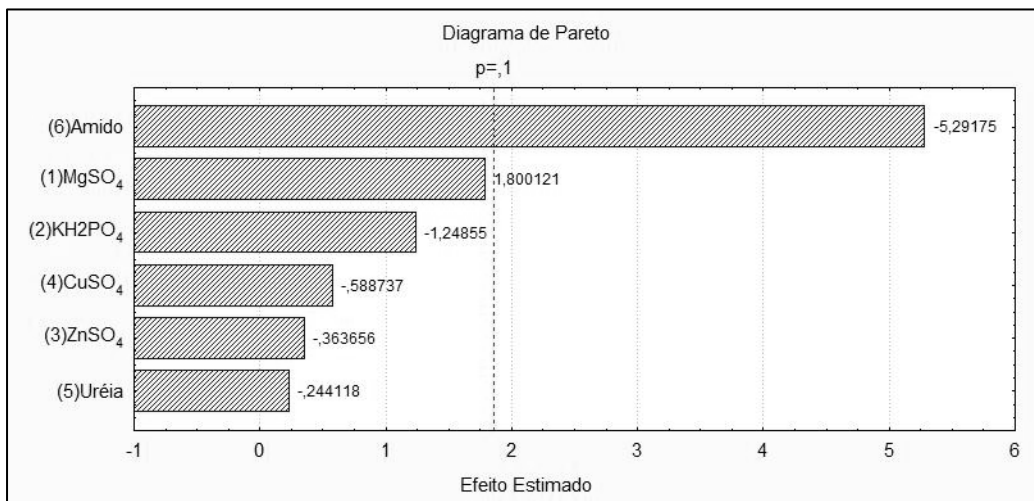


Figura 23 – Digrama de Pareto dos resultados da etapa de otimização da solução nutritiva com 6 variáveis

A análise dos resultados da Tabela 32 foram confirmados com o diagrama de Pareto. Observa-se que a variável significativa nos níveis estudados foi a fonte de carbono (amido) a um nível de significância de 90% ($p < 0,1$). Como a indicação foi para diminuir a concentração de amido e o menor nível utilizado (-1) foi o sem adição de amido, optou-se pelo aumento nos níveis de suplementação de nitrogênio como forma de baixar a relação C/N. O fator $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se apresentou muito próximo da linha de significância, sendo também escolhido para a continuidade dos estudos em um planejamento completo do tipo DCCR. Os resultados de produção de GA_3 obtidos estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 – Resultados do segundo planejamento experimental para a solução nutritiva

<i>Ensaio</i>	<i>MgSO₄</i> (g/L)	<i>Uréia</i> (g/L)	<i>Produção</i> (g GA ₃ /kg de PC)
1	1	1	2,49
2	2	2	3,51
3	2	1	3,99
4	2	2	4,29
5 (axial)	0,795	1,5	2,52
6 (axial)	2,2	1,5	3,29
7 (axial)	1,5	0,795	3,23
8 (axial)	1,5	2,2	7,09
9	1,5	1,5	7,64
10	1,5	1,5	7,25
11	1,5	1,5	7,90

Os melhores resultados de produção de GA₃ (7,9 g/kg de PC seca), foram obtidos com a utilização de 1,5 g/L de uréia e 1,5 g/L de MgSO₄.7H₂O. O menor resultado de produção foi obtido com a utilização de 1 g/L de uréia e 1 g/L de MgSO₄ (2,49 g de GA₃/kg de PC seca). Para analisar as interações entre estas duas variáveis foi utilizada a ANOVA (Tabela 34).

Tabela 34 – ANOVA da otimização das variáveis da solução salina: MgSO₄.7H₂O e uréia

<i>Fator</i>	<i>Soma dos</i> <i>Quadrados</i>	<i>Graus de</i> <i>Liberdade</i>	<i>Médias</i> <i>Quadradas</i>	<i>Razão f</i>	<i>Razão p</i>
(1) MgSO ₄ (L)	1,418723	1	1,418723	2,396103	0,182316
MgSO ₄ (Q)	34,21427	1	34,21427	57,78499	0,000626
(2) Ureia (L)	5,744125	1	5,744125	9,701339	0,02641
Ureia (Q)	10,04863	1	10,04863	16,97128	0,009177
1L com 2L	0,1296	1	0,1296	0,218883	0,659575

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

Observa-se que as variáveis MgSO_4 (quadrático), uréia (linear e quadrática) e a interação entre estas duas apresentam significância com p menor que 0,05. Esta análise confirma os resultados da Tabela 30 onde alterações nas concentrações de MgSO_4 e uréia foram significativas na produção de GA_3 .

A análise da Superfície de Resposta (Figura 24) (R^2 de 0,97) confirma as condições do ponto central do experimento como as melhores para produção de GA_3 .

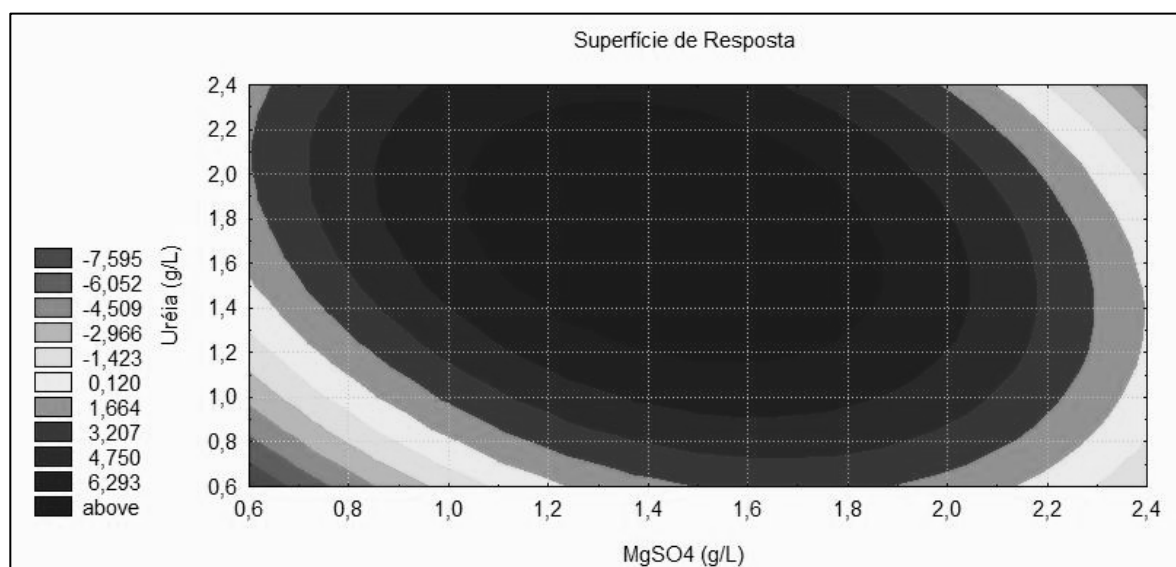


Figura 24 – Superfície de Resposta obtida com os resultados da última etapa de otimização da composição da solução nutritiva

A qualidade e quantidade da fonte de nitrogênio têm um papel importante na produção de GA_3 . Diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas por diversos pesquisadores para estudar seus efeitos que variam de acordo com a cepa e as condições de fermentação (Kumar e Lonsane, 1989; Rademacher, 1997, Berríos *et al.*, 2002). Neste trabalho a suplementação de uréia ao meio forneceu os melhores resultados de produção, o que indica a preferência da cepa *F. moniliforme* LPB 03 por fontes de nitrogênio orgânicas em comparação com as fontes inorgânicas estudadas.

A necessidade de suplementação de magnésio está de acordo com o descrito em literatura, pois dentre os sais minerais importantes na biossíntese de

metabólitos secundários, o magnésio é comumente utilizado nas composições de meios de produção de GA₃ (Tabela 8 em Revisão Bibliográfica). Os outros sais e elementos-traço também importantes como fosfatos, potássio e sulfato estão presentes e disponíveis em quantidades suficientes na PC (Item 3.2 do Capítulo I).

3.4 Cinética Final em Frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão)

Foi realizado um estudo da cinética da produção de GA₃ durante 7 dias a 28 °C em duplicata com as condições otimizadas: pH 5,76 (pH da PC), taxa de inoculação 10% (v/m), PC apenas moída com granulometria menor que 5 mm e 75% de umidade inicial. A umidade foi ajustada com a adição de solução nutritiva contendo uréia a 1,5 g/L e MgSO₄.7H₂O a 1,5 g/L.

Os resultados do acompanhamento deste estudo estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 – Cinética da produção de GA₃ por *F. moniliforme* em FES utilizando PC em frascos de Erlenmeyer

<i>Tempo</i> (h)	<i>g de</i> <i>GA₃/kg</i> <i>de PC</i> <i>seca</i>	<i>Biomassa</i> (g/kg de <i>PC seca</i>)	<i>Umidade</i> (%)	<i>Acúcares</i> <i>Totais</i> (%)	<i>Açúcares</i> <i>Redutores</i> (%)	<i>pH</i>	<i>a_w/T(°C)</i>
0	0	08,578	74,58	20,88	6,25	5,20	0,981/28,7
24	0	74,101	76,16	16,38	5,91	5,40	0,992/28,7
48	1,60	225,315	78,83	5,84	2,45	5,44	0,981/29,1
72	4,30	230,973	79,49	6,06	1,96	6,52	1,002/29,3
96	5,20	317,941	81,21	5,12	1,52	7,38	1,005/29,4
120	4,85	367,859	81,82	5,82	1,48	7,23	1,000/29,4
144	7,60	322,230	83,10	6,14	1,49	7,40	1,001/29,4
168	4,15	322,504	83,12	4,20	1,34	6,86	1,000/29,3

Neste trabalho os valores de atividade de água (a_w) se mantiveram acima de 0,9, durante todo o ensaio cinético, o que é bastante importante para o desenvolvimento do microrganismo. Corona et al. (2005) observaram maiores

produções de GA₃ com valores de a_w aproximados de 0,99 quando utilizado uma cepa de *G. fujikuroi* em FES com farelo de trigo.

Os açúcares fermentescíveis são facilmente utilizados pelo microrganismo em seu desenvolvimento. A relação entre o consumo de açúcares totais e redutores e a produção do GA₃ por *F. moniliforme* LPB 03, utilizando PC como substrato/suporte, pode ser observada na Figura 25.

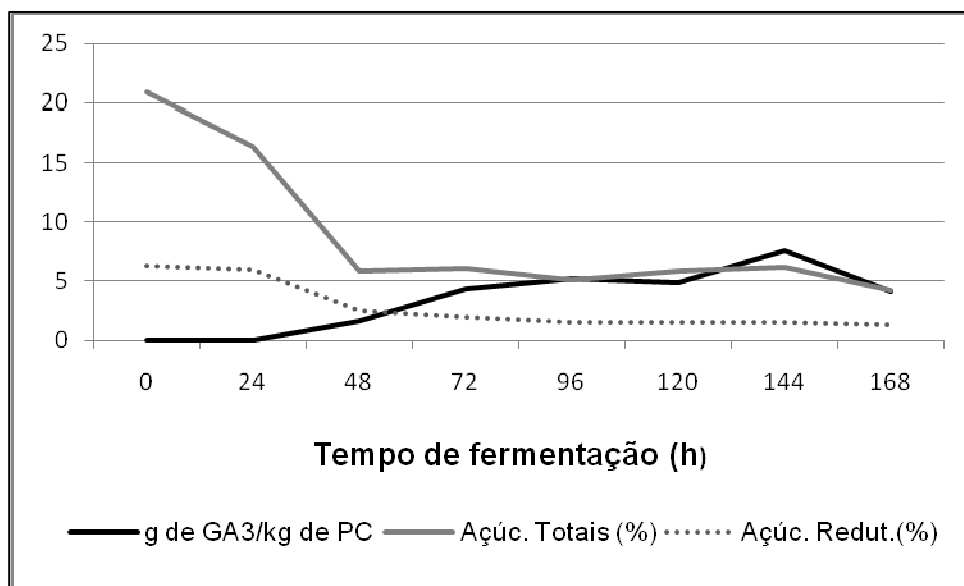


Figura 25 – Consumo de açúcares totais e redutores e formação de GA₃ durante o processo fermentativo

Com a análise do gráfico da Figura 26 pode-se perceber um estágio de adaptação do fungo ao meio de fermentação nas primeiras 24 horas, quando então se inicia o consumo de açúcares. Este consumo fica mais acentuado a partir de 48 h quando se inicia a produção de GA₃. A formação micelial é observada em 24 horas (Tabela 35), o que acarreta o início do consumo de açúcares redutores presentes no meio.

O perfil de crescimento da cepa *F. moniliforme* LPB 03 nesta fermentação foi característico de produção de metabólito secundário (Figura 26). Observa-se uma fase lag de 0 até 24 horas de fermentação quando então se inicia uma fase logarítmica de 24 até 120 horas, com aumento crescente de biomassa alcançando a estabilidade a partir de 120 horas.

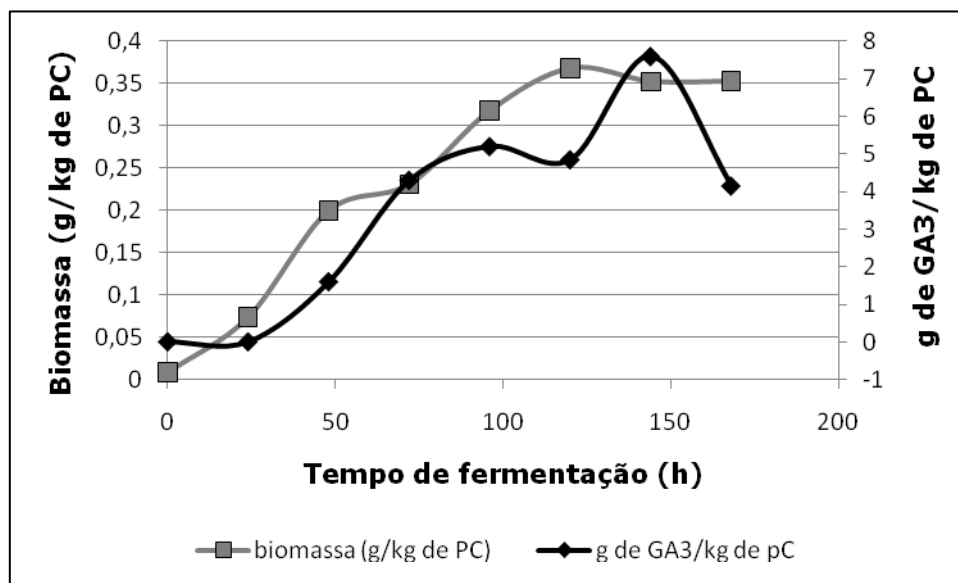


Figura 26 – Perfil de crescimento do *F. moniliforme* em PC durante produção de GA₃

A maior produção de GA₃ foi atingida em 144 horas (7,6 g de GA₃/Kg de PC seca) quando já havia sido formada biomassa suficiente e todo o açúcar necessário estava disponível ao metabolismo e produção do GA₃. A partir de então, a quantidade de açúcares totais e redutores estabiliza em torno de 6 % e 1,5 %, respectivamente. Provavelmente esta é uma quantidade limitante para a sobrevivência do fungo que, assim, começa a utilizar outras fontes de carbono como o próprio GA₃ para sua manutenção. A queda na concentração de GA₃, após 144 horas de fermentação, pode ser devido a este fato aliado à degradação do GA₃ e sua transformação em outras moléculas necessárias à sobrevivência do fungo.

Os valores de pH e umidade acompanharam o processo de produção de GA₃ (Figura 27). Pode-se observar que o pH e umidade começaram a aumentar no início da produção de GA₃ e alcançaram seus maiores valores quando o maior acúmulo de GA₃ foi observado (144 h).

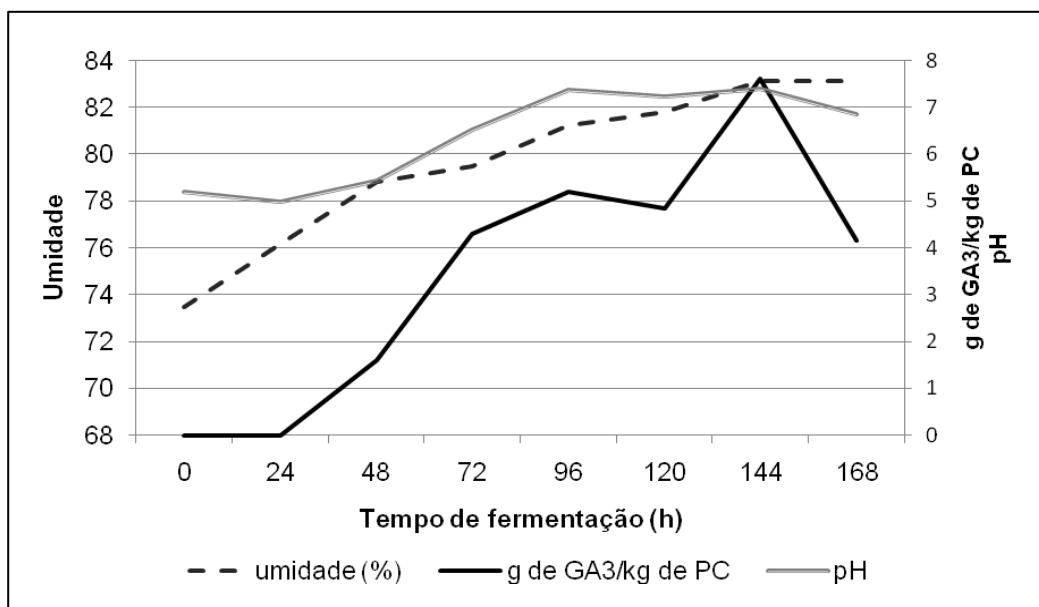


Figura 27 – Desenvolvimento do pH e umidade durante o processo fermentativo de produção do GA₃

A produção de amônia é observada durante o processo de produção de GA₃ quando a fonte de carbono começa a ficar limitada (Borrow *et al.*, 1964a, 1964b) o que justifica o perfil de aumento de pH um pouco mais acentuado após 72 horas do processo fermentativo quando se estabiliza em um mínimo a quantidade de açúcares do sistema.

3.5 Produção de GA₃ em Biorreatores do Tipo Coluna com Aeração Forçada

Os testes do efeito aeração forçada sobre a produção de GA₃ foram desenvolvidos em biorreatores do tipo coluna de vidro. Foram utilizadas as condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer. A umidade inicial pode sofrer alteração, já que a aeração das colunas é feita com ar saturado, o que pode

modificar o equilíbrio água-matriz sólida do substrato. Desta forma, a umidade inicial foi incluída como variável nos estudos com aeração forçada. Os resultados obtidos sobre o efeito da umidade e aeração, durante a primeira etapa de otimização, estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 – Resultados do primeiro planejamento experimental do tipo 2² com 3 repetições no ponto central para colunas com aeração forçada

<i>Ensaio</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Aeração (mL/min)</i>	<i>g de GA₃/kg de PC seca)</i>
1	80	90	5,63
2	80	30	4,07
3	70	90	4,94
4	70	30	7,26
5	75	60	6,21
6	75	60	5,74
7	75	60	5,33

Quando analisados os resultados de produção isoladamente, a melhor condição de produção foi utilizando 70% de umidade inicial com aeração de 30 mL/min (7,26 g de GA₃/kg de PC seca). No entanto, analisando a superfície de resposta (Figura 28) obtida, com R² de 0,91, observa-se uma tendência de aumento na produção para valores mais baixos de aeração e umidade.

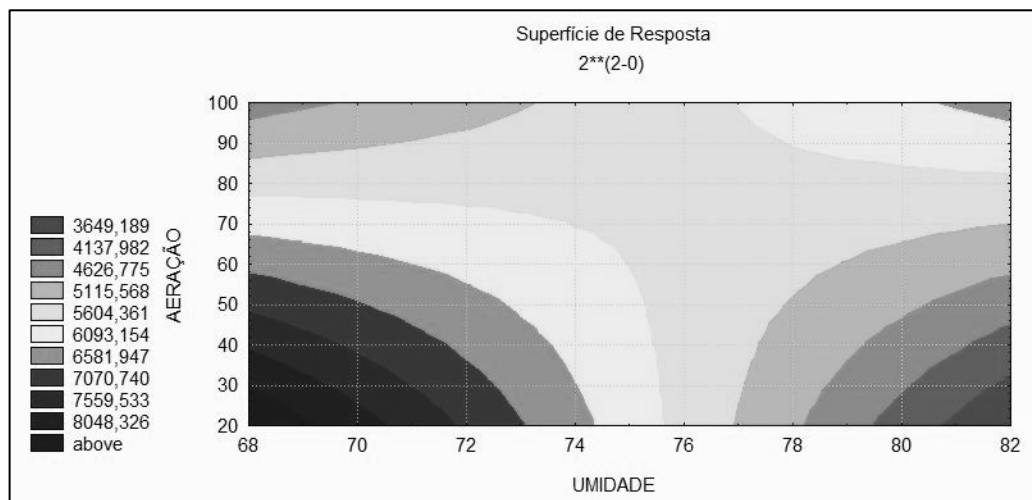


Figura 28 – Superfície de resposta gerada com os resultados da primeira etapa de otimização da fermentação em colunas com aeração forçada

Uma nova série de experimentos utilizando umidades e aerações mais baixas foi realizada na etapa seguinte empregando um planejamento completo do tipo 2^2 com três repetições no ponto central. Os resultados são apresentados na Tabela 37.

Tabela 37 – Resultados do segundo planejamento experimental do tipo 2^2 com 3 repetições no ponto central para colunas com aeração forçada

<i>Ensaio</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Aeração (ml/min)</i>	<i>g de GA₃/kg de PC seca)</i>
1	70	60	5,01
2	70	15	5,20
3	60	60	1,52
4	60	15	4,36
5	65	30	5,09
6	65	30	5,11
7	65	30	5,01

Nenhum dos experimentos deste planejamento apresentou resultados de produção de GA₃ maiores que os obtidos anteriormente cujas condições eram:

umidade de 70% e aeração de 30 mL/min (7,26 g de GA₃/kg de PC seca). Analisando a superfície de resposta (Figura 29), obtida com R² de 0,71 observa-se uma tendência a maiores produções do hormônio para maiores valores de umidade inicial e menores valores de aeração.

Valores de R² acima de 0,7 são considerados satisfatórios em fermentações, uma vez que existe um grande número de variáveis envolvidas no processo, cujos resultados dependem de organismo vivo. Neste experimento em especial, a variável da aeração também pode ter sido uma causa de erros devido a limitações operacionais. Em níveis de aeração abaixo de 30 mL/min houve muita oscilação da aeração, o que dificultou o seu controle durante a fermentação.

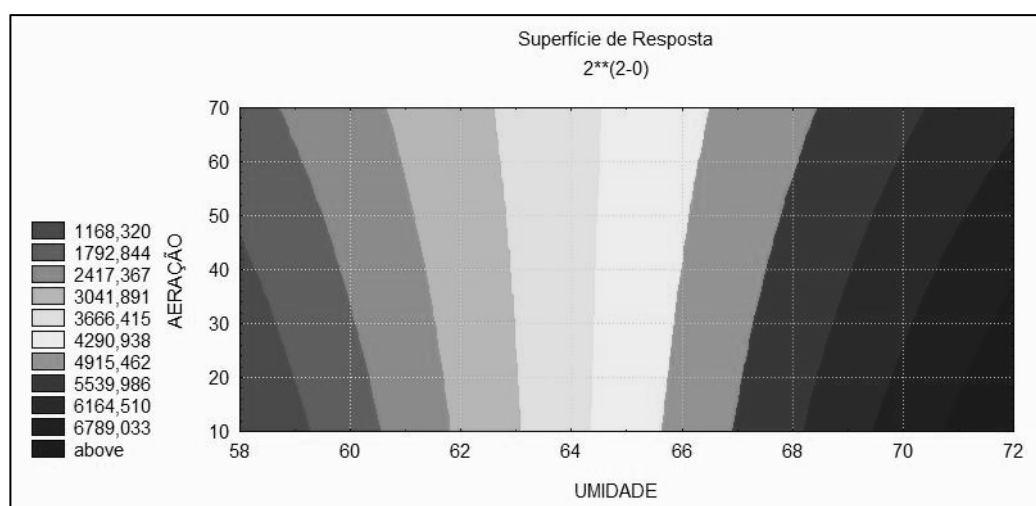


Figura 29 – Superfície de resposta gerada com os resultados da segunda etapa de otimização da fermentação em colunas com aeração forçada

Analisando os resultados obtidos nos dois planejamentos experimentais realizados para otimização da produção de GA₃ em colunas com aeração forçada, observa-se que em ambos, existe uma tendência à utilização de níveis de aeração mais baixos. O sistema se manteve estável com vazões acima de 30 mL/min, a qual foi definida para a realização dos próximos experimentos.

Com relação à umidade, observou-se, no primeiro experimento, uma tendência de maior produção de GA₃ com a utilização de umidades menores do

que 70%. No segundo experimento, a maior tendência de produção do hormônio foi observada para valores de umidades maiores do que 70%. Desta forma, optou-se pela escolha da umidade inicial de 70% e aeração de 30 mL/min.

3.6 Cinética Final em Colunas de Vidro com Aeração Forçada

Foi realizado um estudo da cinética da produção de GA₃ durante 7 dias a 28 °C em duplicata com as condições otimizadas: pH 5,76 (pH natural da PC), taxa de inoculação 10% (v/m), PC apenas moída com granulometria menor que 5 mm, 70% de umidade inicial, obtida pela adição de solução nutritiva contendo uréia a 1,5 g/L e MgSO₄.7H₂O a 1,5 g/L e aeração de 30 mL/min. Os resultados do acompanhamento deste estudo estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38 - Resultados obtidos do acompanhamento da cinética de produção de GA₃ por *F. moniliforme* com PC em FES utilizando colunas de vidro com aeração forçada

Tempo (h)	g de GA₃/kg de PC seca)	Biomassa (g/kg de PC seca)	Umidade (%)	Acúcares Totais (%)	Açúcares Redutores (%)	pH
24	0	191	69,19	20,78	9,16	5,28
48	0	418	71,18	8,35	3,29	5,31
72	0,459	516	72,67	8,85	1,44	6,05
96	1,244	546	74,6	7,94	1,89	5,90
120	7,342	555	76,1	7,17	1,65	7,01
144	5,008	569	76,65	8,04	1,18	7,50
168	4,715	590	75,92	7,68	1,62	7,34

A maior produção de GA₃ foi observada em 120 horas (7,342 g/kg de PC seca em 5 dias) o que representa um ganho de produtividade de 13,72% com relação aos resultados em frascos de Erlenmeyer (7,6 g/kg de PC seca em 6 dias). Esse aumento pode ter ocorrido pela configuração diferenciada do sistema

de biorreatores, o qual propicia aeração forçada e está sujeito à iluminação. Essa influência positiva da aeração sobre a produção de GA₃ havia sido demonstrada por Machado, 2002, que obteve um aumento de 87% em colunas aeradas. A produção de giberelinas pode também ser induzida pela luz (Taiz e Zeiger, 1998), por isso a produção em sistema de fermentação em colunas pode ter auxiliado no aumento desta produtividade.

Provavelmente, a conformação deste biorreator (aeração forçada e exposição direta a luz natural), favoreceu a produção de biomassa que foi maior do que a observada em frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão em estufa sem iluminação). A curva de crescimento do *F. moniliforme* LPB 03 utilizando PC como substrato nos dois sistemas estudados (aeração por difusão e forçada) pode ser observada na Figura 30.

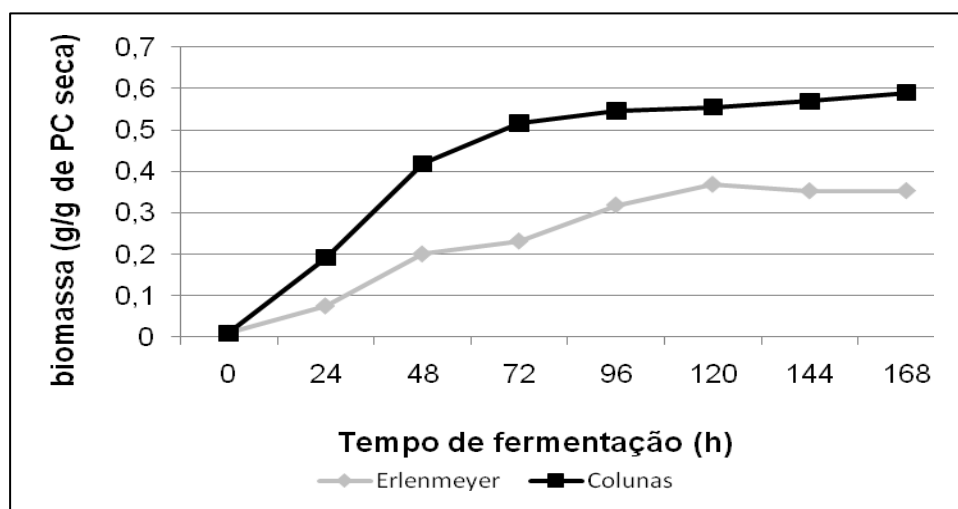


Figura 30 – Comparação da produção de biomassa obtida com fermentação em frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão) e em colunas (aeração forçada).

O perfil de crescimento observado em biorreatores do tipo coluna mostrou uma maior aceleração do que em frascos de Erlenmeyer. A fase exponencial de crescimento com aeração forçada foi mais curta, de 24 até 96 horas. Enquanto, com aeração por difusão esta fase foi de 24 até 120 horas.

O desenvolvimento do pH e da umidade durante o processo (Tabela 38) se manteve no mesmo perfil observado em frascos de Erlenmeyer, ou seja, ocorreu

um aumento a partir do terceiro dia de fermentação, quando começa um maior acúmulo de GA₃.

Com relação ao consumo de açúcares (Figura 31), observa-se o mesmo perfil obtido com a utilização de frascos de Erlenmeyer.

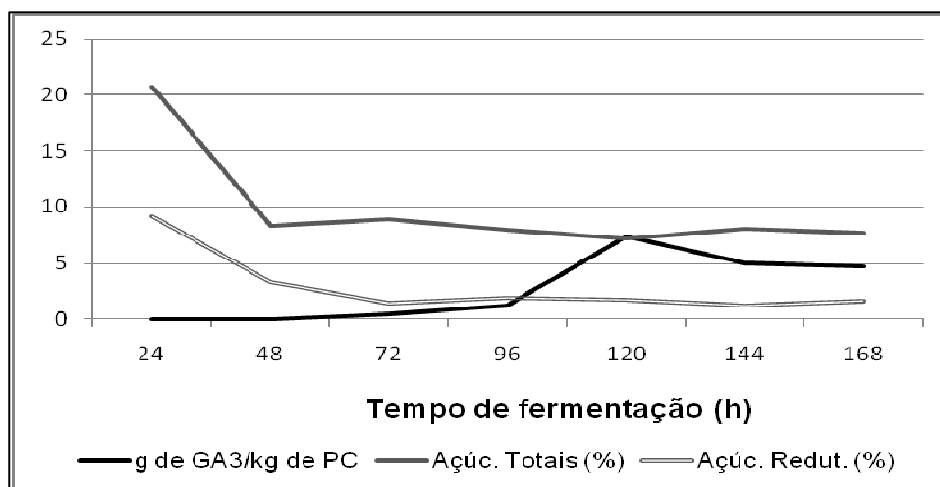


Figura 31 – Consumo de açúcares e formação de GA₃ durante o processo fermentativo em colunas com aeração forçada

O consumo mais acelerado de açúcares e a diminuição do tempo necessário para um maior acúmulo de GA₃ pode estar relacionado a uma aceleração do metabolismo devido à aeração, uma vez que as etapas de biossíntese do mesmo são constituídas de oxidações consecutivas. Desta forma foi avaliado o metabolismo respiratório, processo que está intimamente ligado ao crescimento do microrganismo (Figura 32) (Raimbault, 1997).

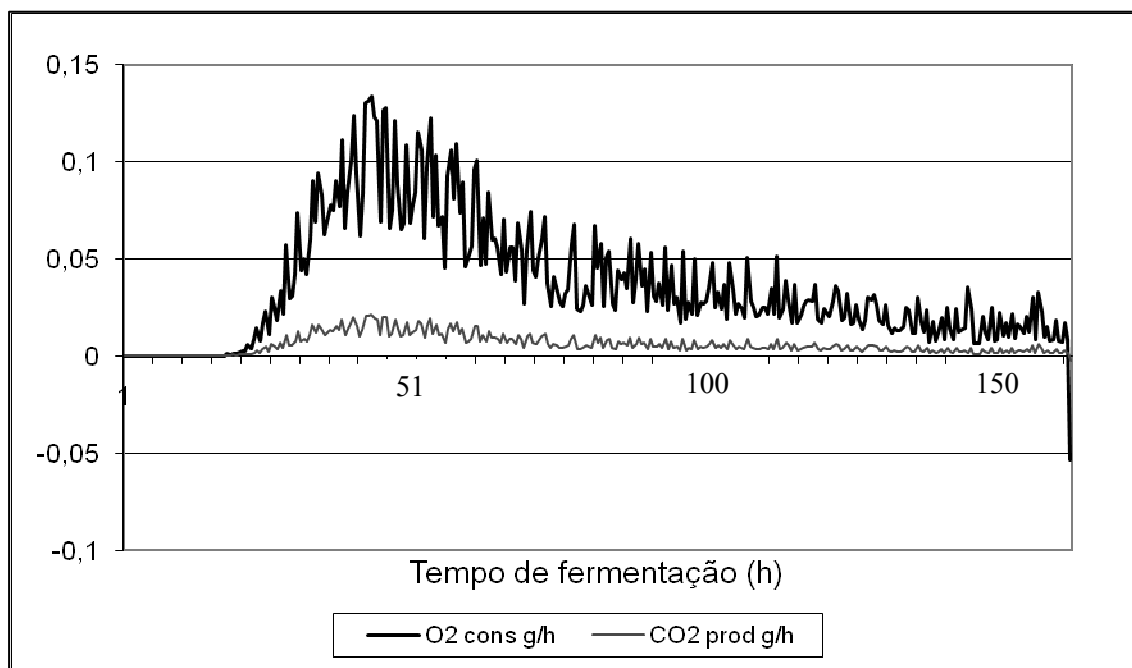


Figura 32 – Produção de CO₂ e consumo de O₂ durante produção de GA₃ por FES com *F. moniliforme* LPB 03 e PC

Apenas a partir de 35 horas de fermentação observa-se o início de uma respiração celular mais acentuada devido ao fato do microrganismo já estar adaptado ao meio e começar a se desenvolver. As maiores taxas de respiração (consumo de O₂ e produção de CO₂) foram observadas em 86 horas de fermentação o que deve estar relacionado à maior produção de biomassa pelo microrganismo. Após 100 horas de fermentação ocorre uma queda brusca na produção de CO₂ e o coeficiente de respiração permanece baixo até o final da fermentação. Isto está relacionado à fase estacionária de crescimento, onde a taxa de respiração é mais baixa e o suficiente para manutenção das células e síntese de metabólitos secundários como é o caso do GA₃.

Com os dados obtidos de consumo de O₂ e produção de CO₂ pode-se estimar a produção de biomassa durante o processo fermentativo através de técnicas numéricas que resolvam as equações diferenciais adequadas. Devido ao número de dados gerados é necessária a utilização de um software para resolver rapidamente estas equações. Neste trabalho foi utilizado o software Fersol II

desenvolvido no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR (Sturm *et al.*, 2008b).

Assim, foi possível estimar a biomassa produzida durante o processo de síntese de GA₃ em colunas com aeração forçada (Figura 33).

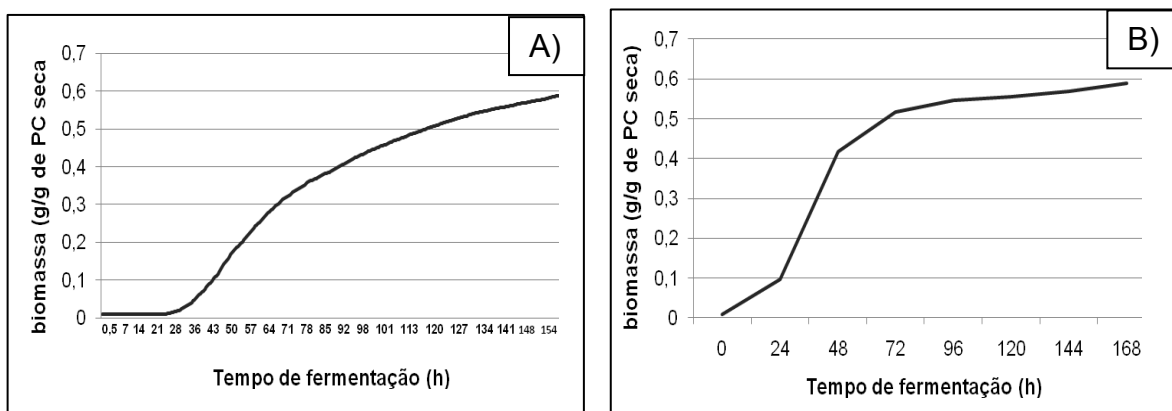


Figura 33 – Cinética de produção de biomassa utilizando biorreator do tipo coluna de vidro com aeração forçada; A) biomassa estimada B) biomassa analisada por ergosterol

O perfil de crescimento do fungo apresenta uma fase lag de 0 até aproximadamente 28 horas, a fase logarítmica se estende de 28 até 100 horas quando a uma desaceleração do crescimento.

Comparando-se os gráficos que mostram os resultados de biomassa real e os resultados de biomassa estimados (Figura 33) obtidos no estudo em colunas com aeração forçada, observa-se que o perfil de crescimento foi semelhante. A curva de crescimento estimada apresenta intervalos em minutos, enquanto as dosagens experimentais por ergosterol foram realizadas a cada 24 horas de fermentação.

Resultados parecidos foram observados por Machado (2002), que relatou que a biomassa estimada e a calculada, a partir do CO₂ produzido, apresentaram boa correlação para uma cepa de *G. fujikuroi* durante o processo de produção de GA₃. Neste caso foi utilizado bagaço de mandioca e casca de café como substratos/suportes.

3.7 Desenvolvimento da Produção de GA₃ Durante o Processo de Otimização

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas várias etapas que compreenderam desde a escolha de cepa e substrato até a otimização das variáveis do processo de produção de GA₃. Um resumo das etapas realizadas e dos respectivos ganhos no processo está apresentado na Tabela 39.

Tabela 39 - Etapas estudadas e respectivos ganhos no processo de produção de GA₃ por FES

<i>Etapas</i>	<i>Máxima produção obtida na etapa</i>	<i>Ganhos no processo</i>
1. Seleção de cepa e substrato/suporte	5,7 g/kg de PC seca em 7 dias	---
2. Otimização do meio de produção de inóculo	5,7 g/kg de PC seca em 7 dias	- Utilização de extrato de PC como meio de produção do inóculo em lugar do meio comercial Czapek; - Diminuição de 72 horas no tempo de produção do inóculo.
3. Cinética de produção de GA ₃ em PC	5,7 g/kg de PC seca em 6 dias	- Diminuição no tempo de produção de GA ₃ em 24 horas (ganho de 19,95% na produtividade).
4. Otimização das variáveis físico-químicas	6,2 g/kg de PC seca em 6 dias	- Utilização da PC apenas moída com granulometria menor do que 5 mm sem classificação posterior; - Diminuição na taxa de inoculação em 5% (de 15%

		para 10% (v/m);
		- Aumento de 8,8% na produção de GA ₃ com relação a etapa 1.
5. Otimização da composição da solução nutritiva	7,6 g/kg de PC seca em 6 dias	- Aumento de 33,3% na produção de GA ₃ com relação a etapa 1.
6. Cinética de produção de GA ₃ em frascos de Erlenmeyer após otimização	7,6 g/kg de PC seca em 6 dias	---
7. Otimização da aeração e umidade inicial em colunas de vidro	7,26 g de GA ₃ /kg de PC seca em 6 dias	---
8. Cinética de produção de GA ₃ em colunas com aeração forçada	7,34 g de GA ₃ /kg de PC seca em 5 dias	- Diminuição no tempo de produção de GA ₃ passando de 144 horas em frascos de Erlenmeyer para 120 horas em colunas com aeração forçada (ganho de 15,26 % na produtividade).

Pode-se observar um ganho significativo em várias etapas do processo fermentativo. A utilização da PC como substrato/suporte e de seu extrato como meio de produção do inóculo, representa vantagens econômicas e ambientais. Além disso, a produção alcançada após as otimizações é considerada bastante significativa quando comparada ao observado em literatura, onde as produções variam de 1 a 5 g/kg de substrato seco (Tabela 2).

4. CONCLUSÕES

Com a conclusão da etapa de otimização do meio de produção de inoculo houve um ganho de 48 horas o que, somado ao fato de se utilizar o mesmo resíduo do processo fermentativo, representa menos gastos no processo produtivo.

Com a escolha dos parâmetros físico-químicos do processo em frascos de Erlenmeyer obteve-se um aumento de 33,3 % na produção de GA₃ (de 5,7 para 7,6 g/kg de PC seca). Com o estudo da aeração forçada em colunas, foi obtido um ganho em produtividade com relação ao observado em aeração por difusão (frascos de Erlenmeyer). A produção passou de 0,053 g/kg PC seca.h⁻¹ quando utilizando frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão) para 0,061 g/kg PC seca.h⁻¹, utilizando colunas com aeração forçada. No sistema de colunas a melhor condição operacional alcançada foi para a menor aeração estudada, o que também representa um ganho econômico. Além disso, os estudos com a respirometria forneceram dados importantes no entendimento do processo fermentativo existindo uma boa correlação entre os dados experimentais e os estimados.

Estes resultados também sugerem a possibilidade de utilização dos dois sistemas de aeração estudados, com os quais foram obtidos bons resultados para os dois tipos de biorreator empregados.

5. REFERÊNCIAS

Berríos J., Illanes A., Aroca G. Spectrophotometric method for determinig gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology Letters*. 2004; 26:67-70.

Borrow, A.; Rothwell, B.; Rothwell, A. et al. Effect of varied temperature on kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* 1964a, 10, n. 3, p. 445-452.

Borrow A., Brown S., Jeferrys E.G., Kessel R.J.H., Lloyd E.C., Lloyd P.B. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology*. 1964b; 10:407-44.

Corona A., Sanchez D., Agostin E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochemistry*. 2005; 40:2655-58.

Carvalho J.C., Pandey A., Oishi B.O., Brand D., Rodriguez-León J.A., Soccol C.R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*; 2006. 29: 262–269.

Kumar P.K.R., Lonsane B.K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*. 1989; 34:29-139.

Machado C.M.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA₃) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA₃ em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2002.

Machado C.M.M., Soccol C.R. and Pandey A. Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002; 102:179-192.

Rademacher W. Gibberellins. In: Fungal biotechnology. Chapman & Hall, London; 1997. p. 193-205.

Raimbault, M. General and microbial aspects of solid state fermentation. In- International training Course on Solid State Fermentation, FMS 97, 6-10 OCTOBRE, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

Sturm W., Dergint D.E.A., Rodríguez-León J.A., Magalhaes D.C.N.V., Soccol C.R.
Chapter 8 Informatics in SSF. In: PANDEY et al. Current Developments in Solid-state
Fermentation. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2008b.

Taiz L, Zeiger E (Eds.). Plant Physiology. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA;
1998.

CAPÍTULO III

ESTUDOS DA PURIFICAÇÃO DO GA₃ PRESENTE NO EXTRATO FERMENTADO DE POLPA CÍTRICA POR *Fusarium moniliforme* LPB 03

RESUMO

Após a otimização das condições do processo fermentativo foram realizados estudos de separação e clarificação do extrato aquoso obtido do material fermentado e purificação do GA₃. Os estudos de separação e clarificação do extrato foram realizados com a utilização de 3 materiais sendo uma sílica (C18), uma resina (XAD16) e 3 tipos de carvão ativo sendo 2 granulados (119 e 141-S) e um pulverizado. Também foram realizados estudos do abaixamento do pH do extrato com posterior extração do GA₃ por partição em balão de extração com acetato de etila. A fase orgânica contendo o GA₃ foi concentrada e resfriada de forma a promover uma cristalização. Os melhores resultados de clarificação de amostra foram obtidos com a utilização da resina XAD16 e do carvão ativo pulverizado. Valores de pHs abaixo de 2,0 com 3 extrações sucessivas com acetato de etila foram as melhores condições estudadas para extração do GA₃ da fase aquosa. Nestas condições obteve-se o maior rendimento do processo para a sílica C18 de 42,6%, enquanto que com a utilização do carvão ativado o rendimento chegou a 73%. Estes resultados são bastante satisfatórios, pois sugerem a utilização de materiais mais baratos (carvão ativado) no lugar da sílica C18 normalmente utilizada nos processos de clarificação de extratos fermentados.

Palavras-chave: ácido giberélico, clarificação

1. INTRODUÇÃO

Quando se trata de produtos de fermentação, especialmente os obtidos por FES, não existe uma metodologia padrão para purificação uma vez que o produto formado encontra-se normalmente diluído em uma mistura complexa de componentes. Desta forma o estudo da purificação da biomolécula utilizando diferentes estratégias é uma das etapas mais importantes num processo.

Além disso, a etapa de purificação é uma das mais dispendiosas industrialmente e, encontrar alternativas para diminuir estes custos torna-se muito importante na transferência do processo da escala laboratorial para a escala piloto e industrial.

A purificação de GA₃ produzido por fermentação utiliza uma clarificação prévia da amostra aquosa com posterior extração por solvente orgânico, concentração e cristalização. O solvente normalmente utilizado para a extração é o acetato de etila (Rangaswamy *et al.*, 2008). A clarificação da amostra é normalmente realizada por uma precipitação de macromoléculas (Holbrook *et al.*, 1961), já que o GA₃ apresenta massa molar de 346,38, relativamente baixa para uma biomolécula.

Alguns autores também utilizam extração em fase sólida para preparação da amostra antes de análise por cromatografia. O agente mais utilizado é a sílica C18 que é ideal para sorção de compostos de média e pouca polaridade como é o caso do GA₃ (Chimelli, 2003).

Desta forma esta etapa do trabalho teve como objetivo o estudo da purificação do GA₃ produzido por FES utilizando PC como substrato e o fungo *F. moniliforme* LPB 03. Para isso foram realizados estudos da clarificação do extrato fermentado utilizando a sílica C18, uma resina XAD 16 e carvões ativados além da extração por solvente orgânico para posterior concentração e cristalização do GA₃.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção do Inóculo de *F. moniliforme* LPB 03

O micélio de *F. moniliforme* LPB 03 foi produzido em tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado, incubado a 30 °C por 7 dias. Estes foram raspados com auxílio de uma alça de platina e inoculados em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de extrato de PC diluído em água (1:10). A suspensão de micélios foi obtida após incubação a 30 °C e agitação de 120 rpm por 7 dias.

O extrato de PC foi produzido utilizando 5 g de PC (previamente seca e moída em moinho de disco de forma a se obter granulometria menor que 5 mm), aos quais foram adicionados 50 mL de água. A mistura foi levada à ebulição por 30 min em banho-maria e após resfriamento, foi filtrada e adicionada de 35 g/L de sacarose.

2.2 Produção de GA₃ por FES

A PC foi inicialmente seca e então triturada em moinho de discos a uma granulometria menor do que 5 mm.

A fermentação ocorreu em colunas de vidro (preparo e sistema fermentativo descritos no item 2.7 do Capítulo II) contendo 35 g de PC nas condições otimizadas na etapa anterior: pH 5,76 (pH natural da PC), taxa de inoculação 10% (v/m), PC apenas moída com granulometria menor que 5 mm, 70% de umidade inicial conseguida com a adição de solução nutritiva contendo uréia a 1,5 g/L e MgSO₄.7H₂O a 1,5 g/L e aeração de 30 mL/min.

2.3 Obtenção do Extrato Fermentado (EF)

A extração do GA₃ produzido foi realizada com 15 g do material fermentado em 45 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,4) homogeneizado em agitador mecânico por 20 min e filtrado. Este material filtrado após a clarificação doravante será chamado de extrato fermentado (EF).

As etapas desenvolvidas para clarificação e purificação do GA₃ produzido por FES em PC, estão apresentadas no fluxograma da Figura 34.

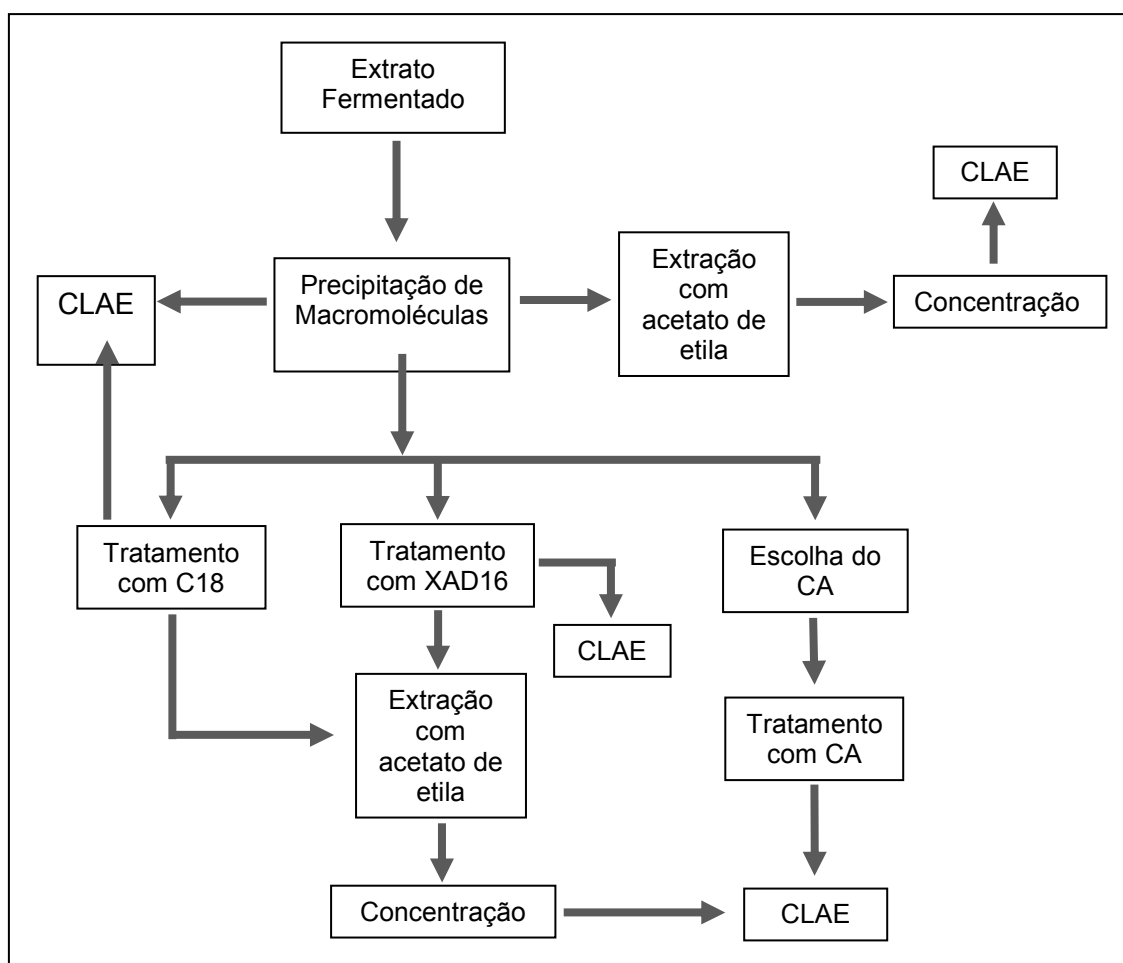


Figura 34 – Fluxograma das etapas desenvolvidas para clarificação e purificação do GA₃ produzido por FES em PC

2.4 Estudo da Purificação do GA₃

Os planejamentos dos experimentos e análises dos resultados foram realizados utilizando o software STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

2.4.1 Estudo da extração do GA₃ com acetato de etila

O EF teve o pH abaixado com HCl 0,1N, de 1,5 a 3,5 e o GA₃ foi extraído com o mesmo volume de acetato de etila (1:1) em balão de extração. Foi empregado um planejamento experimental do tipo Fatorial Completo para 2 variáveis (pH do EF e número de extrações com acetato de etila) e 3 níveis (3² ensaios e 3 repetições no ponto central). Os níveis utilizados para o pH foram: 1,5 (-1), 2,5 (0) e 3,5 (+1); e para o número de extrações com acetato de etila: 2 vezes (-1), 3 vezes (0) e 4 vezes (+1). Este planejamento experimental esta representado na Tabela 40.

Tabela 40 - Planejamento experimental 3² com 3 repetições do ponto central para o estudo de extração do GA₃ do EF com acetato de etila

<i>Ensaio</i>	<i>pH do EF</i>	<i>Nº de extrações com acetato de etila</i>
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	0
6	0	+1
7	+1	-1
8	+1	0
9	+1	+1
10	0	0
11	0	0
12	0	0
Branco*	-	-

* EF antes da extração com acetato de etila

2.4.2 Clarificação do EF

Para a clarificação do EF foram estudados diferentes meios: uma resina Amberlite XAD16 marca Sigma[®], uma sílica C18 marca Waters[®] (Figura 35), três tipos de carvão ativo, sendo dois granulados designados como 119 e 141-S (ambos com granulometria de 8x16) e um em pó da marca Carbomafra[®].



Figura 35 – Foto de colunas utilizadas para limpeza do EF: à esquerda coluna preenchida com resina XAD16 e à direita coluna preenchida com sílica C18

Testes com a resina XAD 16

A resina foi empacotada em coluna de vidro de 125 mL com altura preenchida com resina de 8 cm. Primeiramente a coluna foi condicionada com 100 mL de metanol (PA) e 200 mL de água sob ação de vácuo. Após a acidificação, 100 mL do EF foram percolados através da coluna sob ação da gravidade. Em seguida a coluna foi lavada com 200 mL de água sob vácuo, e finalmente 100 mL do eluente para retirada do GA₃, sendo este analisado. Para o eluente foi estudado a mistura metanol (PA): água (50:50) (Wang *et al.*, 2008).

Testes com a sílica C18

A sílica foi empacotada em coluna de vidro de 125 mL com altura preenchida com sílica de 8 cm. Primeiramente a coluna foi lavada com 100 mL de acetonitrila (PA) e 200 mL de água sob ação de vácuo. Após a acidificação, 100 mL do EF foram percolados pela coluna sob ação da gravidade. Em seguida a coluna foi lavada com 200 mL de água sob vácuo, e finalmente 100 mL do eluente acetonitrila (PA): água (80:20) para retirada do GA₃ (Chimelli, 2003).

Estudos com CA

Para o estudo de adsorção do GA₃ nos diferentes tipos de CA foi realizado um planejamento experimental do tipo Fatorial Completo (Tabela 41) com 11 ensaios para 3 fatores e 2 níveis (2³ ensaios e 3 repetições no ponto central). Os fatores estudados foram o tipo de CA: 119 (-1), pó (0) e 141(+1); tempo de contato: 5 min (-1), 10 min (0) e 15 min (+1) e a velocidade de agitação: sem agitação (-1), 60 rpm (0) e 120 rpm (+1). Nesta etapa foi utilizado 10% (m/v) de CA adicionado ao EF.

Tabela 41 – Planejamento experimental para o estudo de adsorção de GA₃ por diferentes tipos de carvão ativo

<i>Ensaio</i>	<i>Tipo de CA</i>	<i>Tempo de contato</i>	<i>Velocidade</i>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9*	-	-	-
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

*Análise controle = sem passar por contato com CA

Uma coluna de 125 mL foi empacotada com 8 cm do CA selecionado sendo estudadas diferentes vazões de escoamento do EF. Para isso foi utilizado uma bomba peristáltica acoplada à saída da coluna. As vazões estudadas foram 10, 20, 40, 80 e 100 mL/min sendo percolado um volume de 30 mL de EF em cada uma das condições. Após a escolha da vazão foi realizado um estudo da capacidade de adsorção da coluna onde o EF clarificado foi coletado a cada 5 mL (coletor de frações FRAC 200 marca Pharmacia Biotech) e analisado a absorvância a 480 nm até que a alíquota de saída tivesse a mesma absorvância que o EF da entrada da coluna (Figura 36).



Figura 36 – Foto do sistema utilizado para o estudo da vazão na passagem do EF pela coluna de CA

2.5 Concentração

As amostras após extração com acetato de etila foram concentradas em estufa a vácuo até 1/10 do volume inicial. A estufa foi mantida a 35 °C e a pressão abaixo de 0,3 bar. Em seguida as amostras foram guardadas em geladeira para cristalização.

2.6 Análises

A análise do GA₃ por espectrofotometria foi realizada com a acidificação do EF com HCl 30% durante 60 a 80 min a 20 °C e analisado a 254 nm.

Algumas análises foram realizadas utilizando CLAE nas condições anteriormente utilizadas por Machado (2000) onde uma amostra de 20 µL foi injetada e a eluição foi feita com uma mistura do solvente A (metanol) e solvente B (água com pH 3,0 com ácido fosfórico), eluição isocrática (0-15 min, slç A 70% e slç B 30%) e fluxo de 1,00 mL.min⁻¹. A coluna utilizada foi a C-18 a temperatura ambiente e detector de UV a 210 nm. A determinação do GA₃ foi realizada pelo método de calibração externa. Para isso foi determinada uma curva de calibração com soluções de GA₃ em etanol nas concentrações de 0,025 g/L, 0,050 g/L, 0,100 g/L, 0,125 g/L e 0,25 g/L.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Estudo da Precipitação de Macromoléculas do EF

Foi realizado um estudo da etapa de precipitação de macromoléculas presentes no EF de forma a descobrir a percentagem de recuperação de GA₃ (Tabela 42). Como não foi possível quantificar diretamente o extrato obtido apenas com a extração em tampão fosfato (pH 7,4) e posterior filtração, foram realizados testes com solução padrão de GA₃ em etanol (PA) a uma concentração de 10 mg/L.

Tabela 42 – Resultados do estudo da recuperação do GA₃ após clarificação do EF por precipitação

<i>Ensaio</i>	<i>GA₃</i>
Após precipitação	10,07± 0,035 mg/L
Sem precipitação	9,95±0,081 mg/L

Com estes resultados foi considerado que não há perdas de GA₃ no processo de clarificação do EF por precipitação.

3.2 Estudo da purificação do GA₃

O GA₃ é solúvel em etanol, metanol e soluções aquosas alcalinas, solubilizando-se com alguma dificuldade em acetato de etila, água e éter (Kumar e Lonsane, 1989). Como o GA₃ do EF está solubilizado em solução aquosa levemente alcalina (tampão fosfato pH 7,4) faz-se necessário um abaixamento do pH de forma a que sua passagem para o acetato de etila seja facilitada.

Desta forma partiu-se para a realização da extração do GA₃ presente no EF utilizando acetato de etila, para posterior concentração e purificação, onde pH do EF e o numero de extrações com este solvente foram estudados. Os resultados são apresentados na Tabela 43.

Tabela 43 – Resultados do estudo de extração do GA₃ do EF para o acetato de etila

<i>Ensaio</i>	<i>pH do EF</i>	<i>Nº de extrações com acetato de etila</i>	<i>% de GA₃ recuperado*</i>
1	1,5	2	43,5
2	1,5	3	61,7
3	1,5	4	60,9
4	2,5	2	48,45
5	2,5	3	50,52
6	2,5	4	57,73
7	3,5	2	35,05
8	3,5	3	31,96
9	3,5	4	24,74
10	2,5	3	45,36
11	2,5	3	50,52
12	2,5	3	46,39

* Resultados referentes à comparação com valores de GA₃ do EF

O pH onde se obteve os piores resultados, foi o pH 3,5 ficando abaixo de 40% de recuperação do GA₃, independente do número de extrações com acetato de etila. Com pH de 2,5 os resultados variaram entre 45 e 57% de recuperação do GA₃, sendo que o melhor resultado para este pH foi obtido com a utilização de 4 extrações com acetato de etila (57,73%).

Os melhores resultados de recuperação de GA₃ foram obtidos nas condições dos ensaios 2 e 3 da Tabela 43. Com a ANOVA (Tabela 44) podemos analisar o nível de significância dos fatores estudados

Tabela 44 – ANOVA dos resultados obtidos com o estudo da extração do GA₃ do EF com acetato de etila

<i>Fator</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Médias Quadradas</i>	<i>Razão f</i>	<i>Razão p</i>
(1) pH (L+Q)	1132,025	2	566,0127	19,3012	0,001417
(2) N ^o de extrações (L+Q)	53,55625	2	26,77813	0,913142	0,444243

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

O pH se apresenta como o fator mais significativo neste estudo com p menores que 0,05, representando mais de 95% de significância. Analisando somente os resultados da Tabela 44, o número de extrações com acetato de etila também apresentou diferenças na recuperação do GA₃ presente no EF. Desta forma foi gerada uma superfície de resposta com R² = 0,86 a um nível de significância de 95% (p>0,05) (Figura 37).

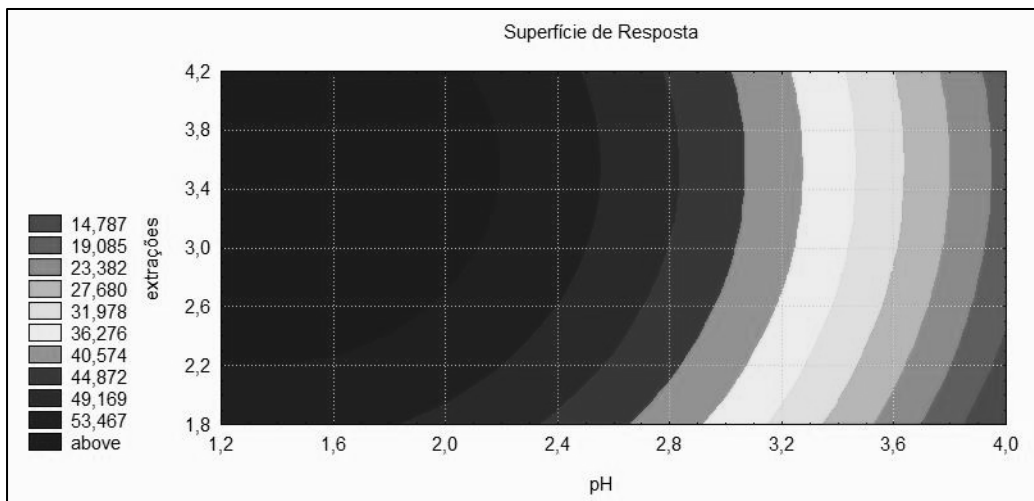


Figura 37 – Superfície de resposta obtida com os resultados do estudo de pH do EF e número de extrações com acetato de etila

A superfície de resposta confirmou a importância do pH com melhores recuperações de GA_3 utilizando o menor nível de pH estudado (pH 1,5) mas também, confirmou que o número de extrações com acetato de etila não influenciou, dentro dos níveis estudados, na recuperação de GA_3 .

Desta forma, como os objetivos desta etapa foram, além de aumentar o rendimento do processo, diminuir a quantidade de solvente utilizado, as condições escolhidas foram: abaixamento do pH do EF clarificado para 1,5 - 2,0 e utilização de 3 extrações com acetato de etila onde obtivemos a maior recuperação de GA_3 (61,7%).

Estes resultados estão próximos aos de literatura onde Calam e Nixon (1961- United States Patent nº 2990337) utilizaram pH 3,0 e 3 extrações com acetato de etila, enquanto Rangaswamy et al. (2008 – United States Patent nº US2008/0085543) utilizaram pH 2,5.

Após a extração, o solvente foi evaporado de forma a promover a sua concentração até saturação, e em seguida este foi resfriado para obtenção dos cristais de GA_3 .

Mesmo após a clarificação e extração com solvente orgânico, o produto ainda apresentou impurezas que lhe conferiram cor amarelada (acentuada no

processo de concentração – Figura 38). Com isso, optou-se por estudar um método de clarificar o EF para que fosse obtido um produto purificado.

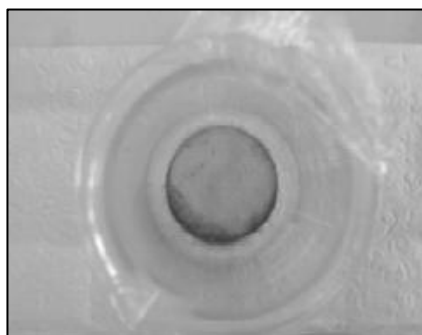


Figura 38 – Foto do fundo de béquer contendo GA₃ do EF após extração com acetato de etila e concentração em estufa a vácuo

3.2.1 Clarificação do EF

Como foi observada coloração no extrato mesmo após a precipitação de macromoléculas e extração com acetato de etila, este (EF) foi analisado por CLAE (Figura 39) de forma a observar a presença de componentes a serem eliminados no processo de purificação do GA₃ produzido.

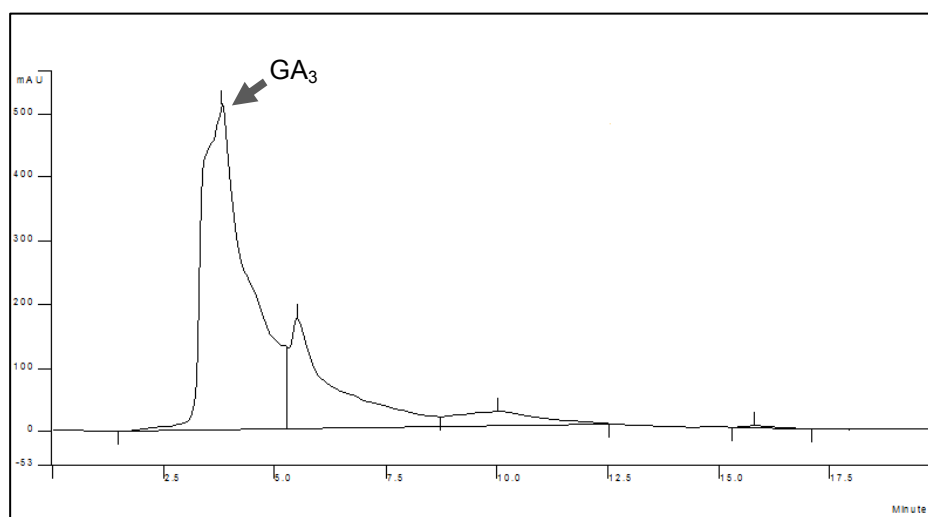


Figura 39 – Análise do EF por CLAE

Com o cromatograma obtido observa-se além do GA₃, a presença de outros componentes com pouca separação entre estes. Sendo assim, a análise e quantificação do GA₃ nestas condições ficam impossibilitadas.

A técnica de análise por CLAE oferece resultados reais quando existe uma boa separação entre os picos referentes aos componentes da amostra. Em fermentados onde a natureza do extrato a ser analisado é, em geral, bastante complexa, esta técnica fica vinculada a uma limpeza e preparo rigoroso da amostra, além do desenvolvimento da metodologia de análise.

Desta forma, até esta etapa dos estudos utilizou-se a metodologia de análise por espectrofotometria de UV, já que o material analisado não apresentava boa separação dos componentes por CLAE (Figura 39). Além disso, a metodologia de espectrofotometria de UV utilizada é bastante específica para a análise de GA₃, sendo bastante útil quando se têm um grande número de análises a realizar.

No caso da análise de giberelinas a metodologia de análise por CLAE é conhecida (Machado, 2000; Chimelli, 2003; Shukla *et al.*, 2005), assim foram realizados estudos da clarificação do EF após a precipitação das macromoléculas.

Os experimentos foram realizados com a utilização de um tipo de resina do tipo amberlite XAD16 empregada por Wang *et al.* (2008) em estudos de adsorção de GA₃. Uma sílica do tipo C18 amplamente estudada na limpeza de extratos para análise do hormônio vegetal (Escamilla *et al.*, 2000, Machado, 2000, Chimelli, 2003) também foi utilizada. Foram também testados diferentes tipos de carvão ativo devido a sua conhecida capacidade de remoção de diversas moléculas (Carbomafra, 2010).

Primeiro foi determinada a curva padrão de GA₃ em CLAE de forma a observar o perfil do cromatograma obtido. Foi utilizada uma solução padrão em diferentes concentrações, bem como o tempo de retenção do GA₃. Obteve-se uma boa correlação entre os resultados com um $R^2 = 0,9971$.

A Figura 40 apresenta o cromatograma da solução padrão de GA₃ a uma concentração de 0,125 g de GA₃/L.

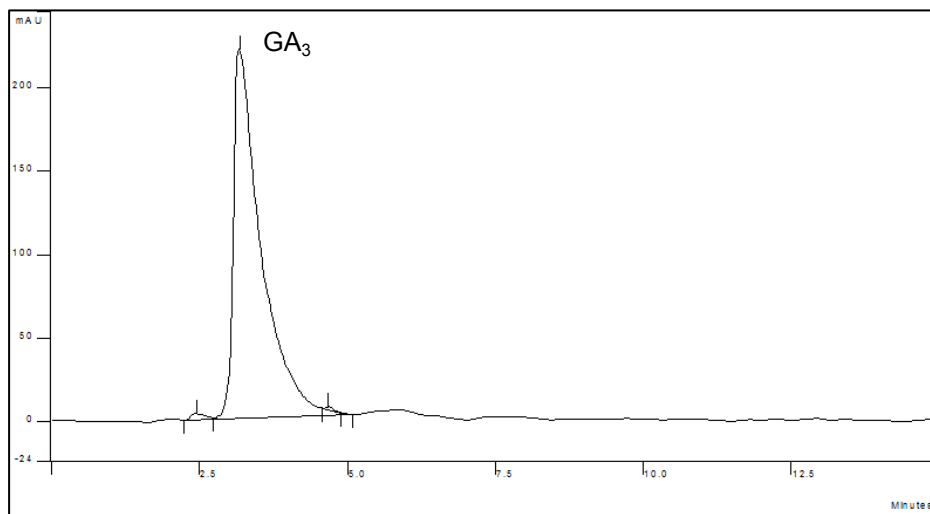


Figura 40 – Análise de solução de GA₃ padrão (99%, marca Akros) a 0,125 g/L realizada por CLAE

O tempo de retenção do GA₃ foi identificado em 3 min sendo observada a presença de outros componentes em pequena quantidade (pequenos picos 1 a direita e 1 a esquerda do pico de GA₃), provavelmente representados pela porcentagem de aproximadamente 1% de impureza especificada pelo fabricante do padrão utilizado.

Testes com a sílica C18

Com o tratamento com sílica C18 o EF se mostrou visivelmente mais límpido. Posteriormente foi analisado por CLAE (Figura 41).

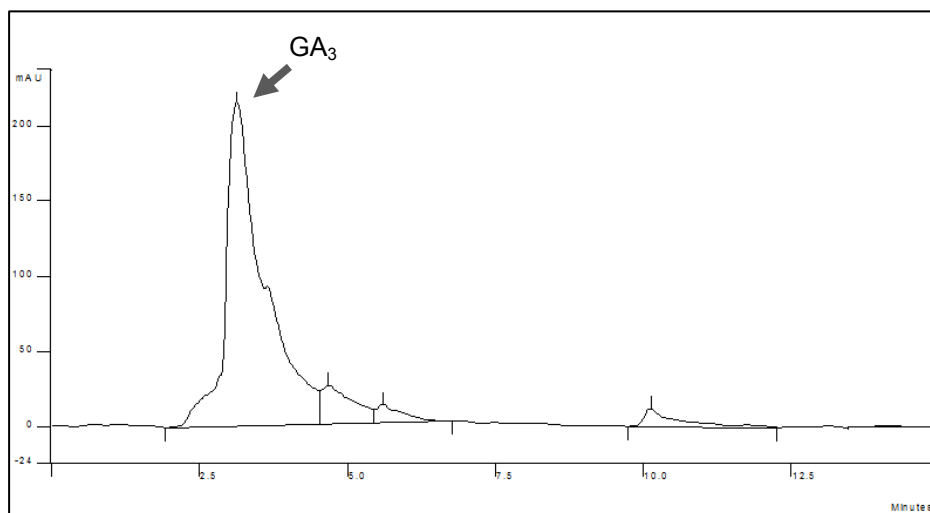


Figura 41 – Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela sílica C18

Após o tratamento com sílica C18 a amostra apresentou melhor separação dos componentes quando comparado ao cromatograma do EF que não sofreu o mesmo tratamento (Figura 39).

Foram analisados os extratos na saída da coluna de C18 de forma a identificar possíveis perdas de GA_3 no processo, estes resultados estão apresentados na Tabela 45.

Tabela 45 – Análise da porcentagem de GA_3 nos extratos tratados em coluna de C18

<i>Extratos analisados (C18)</i>	<i>GA_3^*</i>
EF percolado pela coluna	39,8±0,3%
Água de lavagem da coluna	19,4±0,1%
GA_3 eluido	42,6±0,3%

*% de GA_3 presente no extrato em comparação a EF antes da passagem pela coluna

Considerando que o extrato a ser utilizado é o eluido com a mistura de solventes, onde o GA_3 deve ser liberado, a coluna de C18 apresentou 42,6±0,3% de rendimento. Foi possível observar que a coluna nas condições estudadas, não

conseguiu reter totalmente o GA₃ presente no EF, sendo descartada uma quantidade significativa de 39,8±0,3%. Assim, novos estudos deverão ser realizados como, por exemplo, repassar o EF novamente pela coluna.

Após passagem pela sílica, o EF foi submetido à extração com acetato de etila, nas condições estudadas anteriormente, foi concentrado e o produto obtido dissolvido em etanol (PA). O extrato orgânico foi então analisado por CLAE (Figura 42).

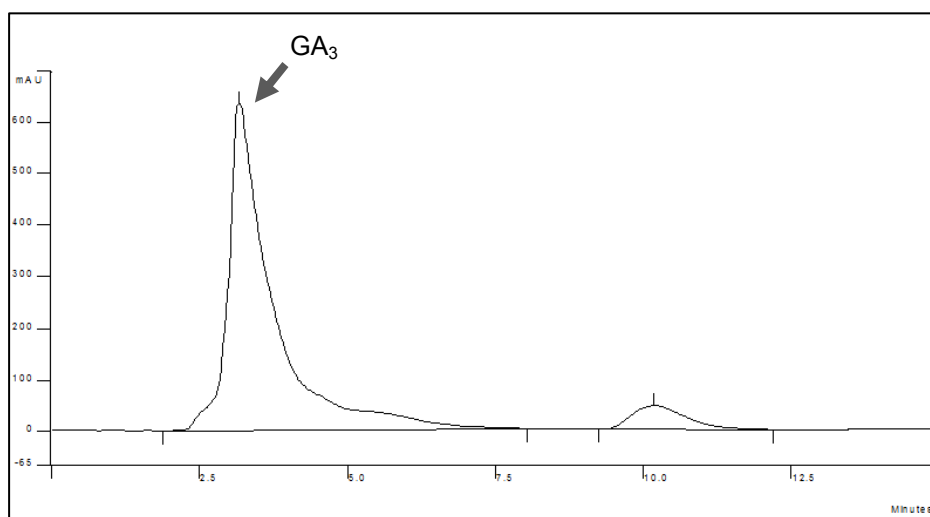


Figura 42 – Cromatograma do EF após passagem pela sílica C18, extração com acetato de etila, concentração e refrigeração

O cromatograma obtido se apresentou mais limpo, embora ainda com alguns componentes aparecendo muito próximos ao pico de GA₃ e, portanto, sendo quantificados no mesmo tempo de retenção. Mas comparando-se os cromatogramas das Figuras 42 e 43, pode-se observar que a extração com acetato de etila também foi significativa no que diz respeito à clarificação da amostra.

Testes com a resina XAD16

O cromatograma resultante da CLAE do EF eluído através da coluna contendo a resina XAD 16 é apresentado na Figura 43.

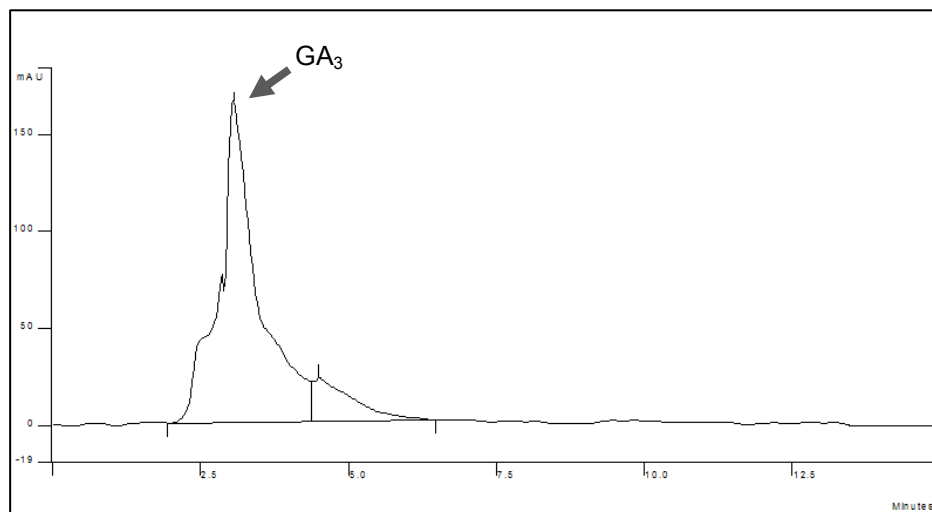


Figura 43 – Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela coluna de resina XAD16

O cromatograma embora apresente uma separação mais visível entre os componentes da amostra, do que o observado para a amostra sem o tratamento com a resina XAD16. Pode-se dizer que a limpeza da amostra de EF, após tratamento com a resina XAD16, é semelhante ao obtido com a sílica C18.

Este resultado pode representar uma vantagem econômica, visto que a sílica C18 tem um valor 10 vezes maior do que a resina XAD16. Mas, estudos sobre a capacidade de reutilização destes dois materiais também deverão ser realizados, pois em longo prazo a sílica C18 pode representar menores custos no processo.

Após passagem pela resina XAD16, o EF foi extraído em acetato de etila, concentrado e o produto obtido foi dissolvido em etanol (PA) e analisado por CLAE (Figura 44).

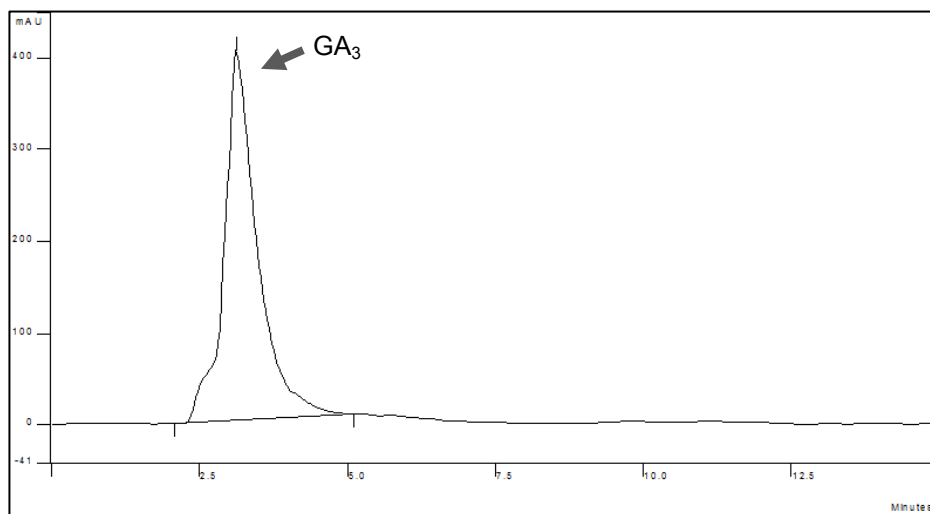


Figura 44 - Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela coluna de resina XAD16, extraído com acetato de etila, concentrado e resfriado

O cromatograma obtido apresenta apenas um possível componente com tempo de retenção pouco abaixo de 3 min que ainda não está separado do pico de GA₃. Mas, o produto obtido utilizando a resina XAD16 apresentou-se mais limpo do que o obtido com a utilização da sílica C18, embora visualmente ainda apresente coloração levemente amarelada após a concentração.

Também foram analisados os extratos na saída da coluna de XAD 16 de forma a identificar possíveis perdas de GA₃ no processo, estes resultados estão apresentados na Tabela 46.

Tabela 46 – Análise da porcentagem de GA₃ em cada extrato passado pela coluna de XAD 16

<i>Extratos analisados (XAD 16)</i>	<i>GA₃*</i>
EF percolado pela coluna	36,11±0,1%
Água de lavagem da coluna	17,6±0,5%
GA ₃ eluido	35,2±0,2%

*% de GA₃ presente no extrato em comparação a EF antes da passagem pela coluna

O rendimento com a passagem pela coluna de XAD 16 foi aproximadamente 7,4% menor do que o observado para a sílica C18, embora as perdas nos extratos anteriores a passagem do eluente tenham sido parecidas. Tal fato pode indicar que nem todo GA₃ foi eluído da coluna. Dessa forma, novos estudos deverão ser realizados com a XAD 16 como, por exemplo, repassar o EF pela coluna, encontrar a melhor vazão e alterar a proporção e o tipo de solventes da mistura de eluição do GA₃.

Testes com carvão ativo (CA)

Os estudos nesta etapa foram iniciados com a escolha do tipo de carvão ativo, o qual não deveria adsorver o GA₃, mas apenas clarificar o EF. Por este motivo a capacidade de adsorção de três tipos de carvão foi testada utilizando um planejamento experimental do tipo Fatorial Completo. Os resultados são apresentados na Tabela 47.

Tabela 47 – Resultados do planejamento experimental para o estudo de adsorção de GA₃ por diferentes tipos de carvão ativo

<i>Ensaio</i>	<i>Tipo de CA</i>	<i>Tempo de contato</i>	<i>Velocidade</i>	<i>% de GA₃ recuperado*</i>
1	119	5 min	s/agitação	68,08
2	141	5 min	s/agitação	59,81
3	119	15 min	s/agitação	65,43
4	141-S	15 min	s/agitação	99,50
5	119	5 min	120 rpm	98,80
6	141-S	5 min	120 rpm	71,92
7	119	15 min	120 rpm	54,88
8	141-S	15 min	120 rpm	57,75
9	--	--	---	100,0
10	CA em pó	10 min	60 rpm	52,09
11	CA em pó	10 min	60 rpm	53,00
12	CA em pó	10 min	60 rpm	51,80

* Quantidade de GA₃ que permaneceu em solução (não adsorvido pelo CA)

Com a análise dos resultados poderiam ser escolhidos para uma futura otimização os carvões ativos denominados 141-S e 119 por apresentarem as maiores porcentagem de GA₃ recuperado (99,5 e 98,8% respectivamente). No entanto, o objetivo da escolha do carvão ativo foi o de clarificação do extrato com a menor retenção de GA₃. Neste sentido, observou-se que o único tipo de carvão ativo estudado que realmente clarificou o extrato (retirou a cor alaranjada) foi o carvão ativo em pó (Figura 45).



Figura 45 – Foto dos extratos obtidos do estudo de tipo de carvão ativo, tempo de contato e velocidade de agitação. Tubos numerados segundo os ensaios do planejamento experimental

Desta forma, o carvão ativo em pó foi escolhido para a realização de testes em coluna de vidro de forma a possibilitar a passagem do EF nas mesmas condições de contato testadas anteriormente com a resina XAD 16 e a sílica C18. Nestas condições (coluna de 125 mL preenchida com 8 cm de CA), obteve-se a recuperação de 63% do GA₃ presente no EF com uma limpeza bastante efetiva (Figura 46), o que levou a realização de testes de controle de vazão da passagem de EF pela coluna, de forma a diminuir o tempo de contato do EF ao mínimo necessário para uma máxima clarificação.

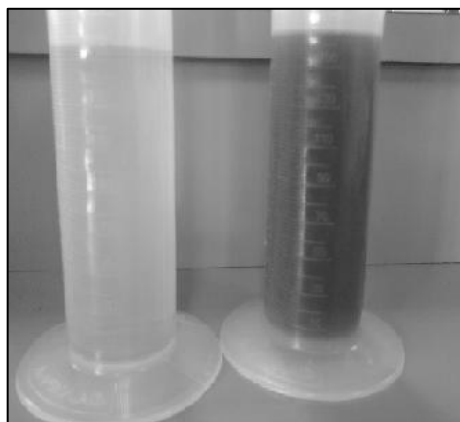


Figura 46 – Foto do EF antes do tratamento em coluna de CA (direita) e após o tratamento em coluna de CA (esquerda)

Os resultados obtidos com o estudo de diferentes vazões na passagem de EF pela coluna de CA estão apresentados na Tabela 48.

Tabela 48 – Resultados da recuperação de GA_3 após passagem do EF por coluna de CA sob diferentes vazões

Vazão	GA_3 recuperado*
10 mL/min	63,0 \pm 02%
20 mL/min	62,1 \pm 05%
40 mL/min	66,0 \pm 02%
80 mL/min	69,2 \pm 03%
100 mL/min	NA

* Quantidade de GA_3 que permaneceu em solução (não adsorvido pelo CA)

NA = não analisado

Com uma vazão de 100 mL/min, não foi possível fazer uma análise real. O CA utilizado apresenta uma granulometria muito fina, o que nas condições utilizadas, o tornou permeável à lã de vidro. Isto impossibilitou a continuidade destes estudos.

A melhor vazão estudada, com a qual se obteve uma porcentagem maior de GA_3 recuperado (69,2%), foi de 80 mL/min. Assim, uma nova coluna foi

empacotada com CA e o EF foi tratado de maneira a estudar a capacidade de limpeza da coluna.

Neste estudo utilizou-se 10 g de CA na coluna por onde foi percolado o EF, sendo coletadas alíquotas a cada 5 mL e analisada a absorbância a 480 nm. Os resultados estão apresentados na Tabela 49 abaixo.

Tabela 49 – Resultados de absorbância das alíquotas coletadas após passagem pela coluna de CA

<i>Volume de EF</i>	<i>Absorbância a 480 nm*</i>
Até 100 mL	0,000
140 mL	0,017
180 mL	0,031
220 mL	0,132
260 mL	0,244
300 mL	0,417
340 mL	0,404
380 mL	0,428
420 mL	0,512
460 mL	0,506
500 mL	0,505
580 mL	0,520

*Como o número de alíquotas foi grande a tabela apresenta apenas os valores representativos da mudança de absorbância.

Não foi possível realizar estudos com maiores volumes de EF devido à necessidade de nova fermentação para produção de mais extrato. Considerando que o EF antes da passagem pela coluna apresentou absorbância de 0,833, os resultados obtidos mostram uma boa capacidade de limpeza da coluna até 180 mL de passagem do EF, quando se observa uma pequena coloração. Com estes resultados considerou-se uma capacidade de clarificação do CA de 18 mL de EF /g de CA nas condições estudadas.

Com isso, após o tratamento na coluna de CA a uma vazão de 80 mL/min, o EF foi analisado por CLAE e o cromatograma obtido é apresentado na Figura 47.

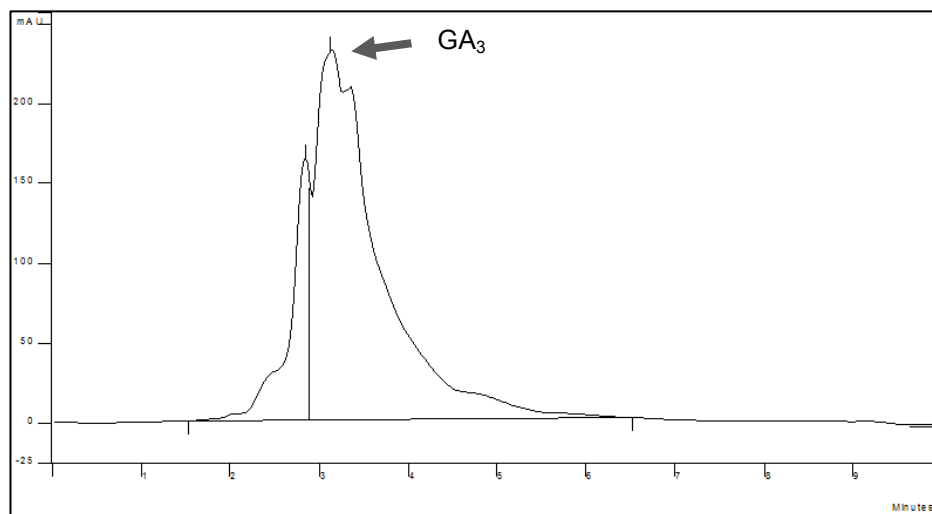


Figura 47 – Cromatograma obtido da análise do EF após passagem pela coluna contendo CA

O cromatograma obtido apresenta componentes com tempo de retenção muito próximos ao do GA₃. Quando comparado o resultado obtido com o tratamento com CA e o resultado com a sílica C18 (Figura 41) e a resina XAD16 (Figura 43), observa-se uma maior quantidade de um componente, cujo tempo de retenção está logo acima do GA₃ (3 min). Tal fato poderia indicar que o tratamento com C18 e/ou XAD 16 seria mais efetivo na limpeza do EF.

Também foi realizada a extração com acetato de etila após tratamento com CA de forma a verificar a pureza do produto final obtido. Este também foi analisado por CLAE (Figura 48).

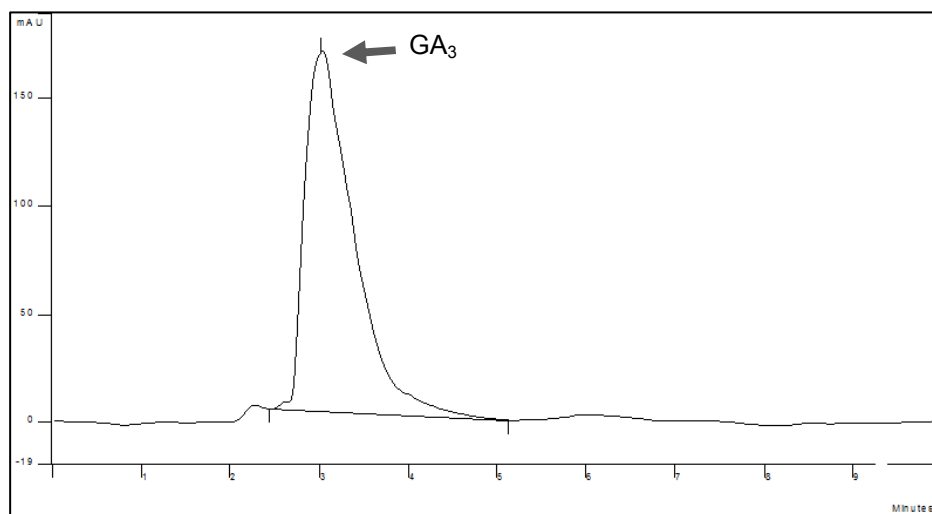


Figura 48 – Cromatograma obtido do EF após passagem pela coluna contendo CA, extraído com acetato de etila, concentrado e resfriado

Com a análise do cromatograma obtido, observa-se uma limpeza efetiva do EF após tratamento na coluna de CA, onde apenas um pequeno pico é notado a esquerda do GA_3 . Este, embora esteja próximo ao tempo de retenção do GA_3 , encontra-se bem separado e está de acordo com o observado no cromatograma obtido com padrão comercial de GA_3 (Figura 38), o qual apresenta aproximadamente 1% de impureza em sua constituição. Além disso, obteve-se um produto visivelmente mais limpo (Figura 49) do que o obtido antes tratamento do EF (Figura 38).



Figura 49 – Foto do fundo do copo de bquer contendo GA_3 purificado

A cristalização é uma etapa bastante importante no processo já que variações nas características de cristalização (grau de saturação, agitação e temperatura) podem dar origem a formas cristalinas diferentes (polimorfismo) com produtos de características diferentes.

A qualidade do cristal é, basicamente, determinada pela velocidade em que o cristal, cresce, aglomera-se ou dissolve-se em diferentes regiões do cristalizador (Herman *et al.*, 1999). Neste trabalho as condições de cristalização ainda não foram estudadas e não houve agitação durante o resfriamento para a cristalização, mesmo assim houve a formação de cristais pequenos e incolores, características visuais normais para cristais de GA₃ (Kumar e Lonsane, 1989).

4. CONCLUSÕES

Embora todos os meios utilizados para clarificação do EF tenham apresentado boas possibilidades de uso, com a utilização de CA obteve-se um maior rendimento 69,2% (comparado a C18 – 42,6% e XAD 16 – 35,2%). Isto representa grandes ganhos econômicos no processo visto que o preço do CA comparado ao da sílica ou mesmo da resina é muito inferior.

Desta forma, as melhores condições estudadas para purificação do GA₃ foram a utilização de coluna de CA com passagem do EF a uma vazão de 80 mL/min, com posterior abaixamento do pH do EF para 1,5 -2,0 e extração com 3 vezes o volume de EF com acetato de etila. Nestas condições, após concentração e resfriamento observou-se a formação de cristais pequenos e transparentes de GA₃.

Este processo apresenta grandes possibilidades de implantação em escala piloto e industrial, pois além de utilizar um resíduo agroindustrial (a PC) na produção de GA₃, o processo de purificação utilizado é simples e relativamente barato, o que industrialmente é um dos fatores mais relevantes.

5. REFERÊNCIAS

Calan C.T. and Nixon I.S. Gibberellic acid manufacture. United States Patent nº 2 990 331, Jun 27, 1961.

Carbomafra - Industrias Químicas Carbomafra S.A. em <http://www.carbomafra.com.br/historico.htm>. Acessado em junho de 2010.

Chimelli M. Obtenção de giberelinas por biotransformação fúngica do esteviosídeo: etapa de deglicosilação. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2003.

Escamilla E.M., Dendooven L., Magaña I.P., Parra R., De La Torre M. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 2000; 76:147-55.

Holbrook A., Edge W., Bailey F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Adv Chem Ser*. 1961; 28, 159-167.

Kumar P.K.R., Lonsane B.K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*. 1989; 34:29-139.

Machado, C. M. M. Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bioresíduos da agroindústria do café. Curitiba, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2000.

Rangaswamy V., Mumbai N., Balu G. Process for gibberellic acid production with "Fusarium moniliforme" strains. United States Patent nº US 2008/0085543 A1, Apr 10, 2008.

Wang, R. Yang, J., Shi Z, Ou L. Separation of gibberellic acid (GA₃) by macroporous adsorption resins. *Front. Chem. Eng. China*. 2008, 2(2), 171-175.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO EXTRATO FERMENTADO DE POLPA CÍTRICA POR *FUSARIUM MONILIFORME* LPB 03 EM BIOENSAIOS COM DUAS ESPÉCIES DE BROMELIAS CULTIVADAS *IN VITRO*

RESUMO

Foram realizados ensaios biológicos comparando-se o uso do extrato fermentado (EF) com um produto comercial padrão de GA₃. As duas fontes de GA₃ foram estudadas em concentrações de GA₃ de 0, 1,5 e 3,0 g/L e suas ações sob as características de crescimento *in vitro* de duas espécies de bromélias (*Nidularium procerum* Lindm. e *Nidularium innocentii* Lem.) foram analisadas durante 50 dias. As características avaliadas foram: altura da parte aérea, número de brotos laterais, percentagem de brotos laterais, número de raízes por explante e número de folhas por explante. Também foi realizado um estudo da estabilidade do EF com relação a quantidade de GA₃ durante 110 dias a temperatura ambiente. Os resultados obtidos com relação a utilização do EF como fonte de GA₃ dependeram da espécie estudada e da concentração de GA₃ utilizada, sendo muito próximos ao observado quando utilizado GA₃ comercial. O EF se apresentou bastante estável a temperatura ambiente com uma queda menor que 10% da concentração de GA₃ em 110 dias de estocagem.

Palavras-chave: micropropagação, estabilidade do extrato, ácido giberélico, *Nidularium procerum* Lindm., *Nidularium innocentii* Lem.

1. INTRODUÇÃO

A floricultura no Brasil vem se expandindo, ganhando qualidade e competitividade e ramificando-se por todas as regiões do país. Considera-se atualmente uma importante atividade econômica no Brasil, com taxas de crescimento de 20% ao ano. As flores de clima temperado, chamadas de tradicionais são as espécies mais requisitadas no mercado mundial com as flores tropicais ainda ocupando um pequeno espaço, mas vem crescendo e conquistando novos consumidores e promotores. As principais características que vem proporcionando o crescimento do comércio de flores tropicais no mercado mundial são: exotividade, menos perecível e maior resistência no transporte em longas distância (Batalha e Buainain, 2007).

A propagação de espécies vegetais *in vitro* apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, como a multiplicação de clones em qualquer época do ano, produção de espécies que dificilmente seriam propagadas por métodos convencionais, rápida multiplicação clonal de espécies raras, além da eliminação de vírus (Gallo e Crocomo, 1995). Dependendo da finalidade da propagação, conforme descrito por Murashige (1974), a cultura de tecidos de plantas pode ser feita utilizando como propágulo inicial tecidos meristemáticos (gemas axilares, regiões apicais e o meristema propriamente dito) e/ou explantes não meristemáticos (pecíolo, pedúnculos e o limbo foliar). Os meios utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

Diferentes aplicações do GA₃ em cultivos de plantas *in vitro*, como aumento do número de folhas (Soares *et al.*, 2009) e comprimento dos brotos (Silva *et al.*, 2004) têm sido reportadas e comprovadas. Os efeitos observados variam de acordo com a espécie, concentração de GA₃, forma de aplicação e até mesmo das condições e etapa de crescimento da planta quando da aplicação do hormônio.

A utilização de GA₃ é realizada a níveis de ppm o que possibilita a comercialização de produtos mais diluídos e em diferentes formas como pó,

líquido ou pastilhas. Para que um produto possa ser comercializado ele deve apresentar entre outras características, um tempo de meia vida alto devendo ser estável a temperaturas de estocagem.

Desta forma este trabalho teve como objetivos testar as possibilidades de utilização do extrato aquoso obtido do fermentado (EF) como fonte de GA₃ com relação a seus efeitos sob diferentes características de duas espécies de bromélias cultivadas *in vitro*, além de realizar um estudo da estabilidade do EF sob armazenamento a temperatura ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados bioensaios com o extrato fermentado (EF) apenas submetido a precipitação sem posterior limpeza por coluna de adsorção. Foi utilizado EF obtido da FES utilizando PC com o fungo *F. moniliforme* LPB 03 sendo que a fermentação para obtenção do EF ocorreu em colunas com aeração forçada nas melhores condições estudadas (70% umidade, aeração de 30 mL/min durante 5 dias).

A análise do GA₃ por espectrofotometria foi realizada com a acidificação do EF com HCl 30% durante 60 a 80 min a 20 °C e analisado a 254 nm.

2.1 Ensaios Biológicos com Bromélias

2.1.1 Obtenção das culturas de bromélias

Duas espécies de bromélias, *Nidularium procerum* Lindm. e *Nidularium innocentii* Lem. foram mantidas *in vitro*. A desinfecção das sementes consistiu da imersão em etanol 70% durante um minuto, seguido por imersão em água sanitária comercial (NaOCl 1%) por 20 min, e lavadas três vezes com água destilada estéril. O meio de germinação foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), com 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar. As mudas foram propagadas *in vitro*, em meio MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2 µM

de ANA (ácido naftaleno acético), 4 μM BAP (6 benzilaminopurina) e solidificado com 6 g.L^{-1} de ágar.

2.1.2 Alongamento e enraizamento *in vitro*

Broto (altura 2 cm e excisão de raiz) de clusters cultivadas *in vitro* foram utilizados como explantes. O meio basal foi o MS com 30 g.L^{-1} de sacarose e solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial ($2 \times 2 \times 3$), sendo testados duas fontes de GA_3 , duas espécies de bromélias e três concentrações de GA_3 . O experimento foi instalado com cinco repetições e cinco plantas por parcela. Após 50 dias de cultura *in vitro* foram analisadas as seguintes variáveis: número de raízes, percentagem de enraizamento, altura da parte aérea (cm), número de folhas, número de brotos laterais por planta, massa fresca (g) por planta e percentagem de brotos laterais foram avaliados após 50 dias de cultivo *in vitro*.

2.1.3 Condições de cultura e análise estatística

Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8, e foram autoclavados a 1 atm e 121 °C por 20 min. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C sob luz fluorescente branca ($28 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com fotoperíodo de 16 horas. Os dados foram submetidos a uma análise de normalidade para o teste de Lilliefors e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey a um $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas seguindo os procedimentos do software GENES (Cruz, 2001).

2.2 Estabilidade do EF a Temperatura Ambiente

Uma amostra de 60 mL do EF foram homogeneizados e separados em tubos contendo aproximadamente 5 mL cada, sendo fechados com tampa de rosca e guardados a temperatura ambiente ao abrigo de luz.

O GA₃ presente no EF foi quantificado no início do experimento, sendo a estabilidade do EF calculada em função da quantificação do GA₃ das alíquotas retiradas e analisadas em intervalos de tempo variados durante 110 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaios Biológicos com Culturas de Bromélias

O número de brotos laterais, o número de raízes por explante, a percentagem de enraizamento e o número de folhas por explante, foram significativos com relação ao tipo de fonte de GA₃ estudado. Desta forma todos os resultados de cada uma das características, foram avaliados de forma a obter mais dados a respeito da atividade do EF. Os resultados analisados após o crescimento das plantas durante 50 dias estão apresentados na Tabela 50.

Tabela 50 - Características observadas aos 50 dias de cultivo *in vitro* sob concentrações de ácido giberélico (GA₃) (para análise) e ácido giberélico presente no EF nas espécies *N. innocentii* e *N. procerum*.

Número de raízes						
GA₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média
0,0 g/L	3,8 aA	3,8 aA	3,8	5,4 abA	5,2 aA	5,3
1,5 g/L	2,4 bA	2,3 bA	2,3	5,0 bA	2,7 bB	3,8
3,0 g/L	2,4 bA	2,2 bA	2,3	5,7 aA	1,4cB	3,5
Média	2,8	2,7		5,4	3,1	
Altura da parte aérea (cm)						
GA₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média
0,0 g/L	4,9	4,8	4,8 b	4,4	5,1	4,7 b
1,5 g/L	7,7	6,3	7,0 a	5,1	5,7	5,4 a
3,0 g/L	7,8	6,2	7,0 a	5,6	5,7	5,6 a
Média	6,8 A	5,7 B		5,0 A	5,5 A	
Enraizamento (%)						
GA₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média
0,0 g/L	92	96	94	100 aA	100 aA	100
1,5 g/L	95	96	95,5	96 aA	72 bB	84
3,0 g/L	88	88	88	100 aA	41,6 cB	70,8
Média	91,6 B	93,3 A		98,6	71,2	
Número de folhas						
GA₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média

0,0 g/L	16,1	16,9	16,5	16,9 aA	16,1 aB	16,5
1,5 g/L	10,5	14,9	12,7	10,7 bB	14,3 bA	12,5
3,0 g/L	11,6	15,9	13,7	11,0 bB	13,3 cA	12,1
Média	12,7 B	15,9 A		12,8	14,5	

Número de brotos laterais por explante

GA ₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média
0,0 g/L	1,8	2,2	2,0	2,0 aA	2,1 aA	2,0
1,5 g/L	0,8	2,4	1,6	0,7 bA	0,9 bA	0,8
3,0 g/L	0,8	2,6	1,7	0,6 bA	0,5 cA	0,5
Média	1,1 B	2,4 A		1,1	1,1	

Brotações laterais (%)

GA ₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média
0,0 g/L	68	65,5	66,7	88 aA	88 aA	88
1,5 g/L	44	77	60,5	53 bA	40 bA	46,5
3,0 g/L	56	65,5	60,7	48 bA	61,2 bA	54,6
Média	56 B	69,3 A		63,0	63,0	

Massa fresca por planta (g)

GA ₃	<i>N. procerum</i>			<i>N. innocentii</i>		
	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média	GA ₃ (PA)	GA ₃ (EF)	Média
0,0 g/L	0,227	0,207	0,217 a	0,476	0,354	0,415
1,5 g/L	0,189	0,189	0,189 a	0,318	0,437	0,377
3,0 g/L	0,212	0,197	0,204 a	0,340	0,304	0,322
Média	0,209 A	0,197 B		0,378	0,365	

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas idênticas nas linhas e por letras minúsculas idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Variáveis sem letras nas colunas e linhas não foram significativas.

A altura da parte aérea apresentou aumento com a utilização das duas fontes de GA₃ independente da espécie de bromélia e concentrações de GA₃ estudada. Este comportamento também foi observado por Mendes *et al.* (2007) em multiplicação *in vitro* de bromélias da espécie *Billbergia distachia* (Vellozo).

Ao contrário, o número de folhas do explante foi a única característica que não apresentou resultados de aumento com a utilização de nenhuma das fontes de GA₃, com relação aos testes em branco (0 g de GA₃/L).

Com relação a espécie de bromélia *N. procerum* houve um aumento no número de brotos laterais com a utilização de EF nas duas concentrações de GA₃ utilizadas e um aumento também com a utilização de EF na percentagem de brotos laterais com a utilização de 1,5 g/L de GA₃. As outras características se apresentaram semelhantes ao obtido com a utilização do GA₃ comercial.

Para a espécie de bromélia *N. innocentii* com a utilização de EF como fonte de GA₃, observou-se menor número de raízes e menor percentagem de enraizamento quando comparado ao obtido com a utilização de GA₃ comercial, embora a percentagem de enraizamento tenha sido menor do que o ensaio em branco (0 g de GA₃/L) para as duas fontes de GA₃ estudadas. Resende *et al.* (2009) observaram comportamento parecido em estudos quando na ausência de GA₃ em meio de crescimento *in vitro* de orquídeas da espécie *Cattleya loddigesii* sp.

Estas diferenças observadas com relação ao tipo de fonte de GA₃ utilizada, provavelmente podem ser justificadas pela natureza da composição do EF. O EF é obtido da extração do GA₃ presente no fermentado de PC com tampão fosfato. Assim, no EF, além de GA₃, estão presentes alguns componentes da PC solubilizados em tampão fosfato. Estes componentes podem ter potencializado a ação hormonal do GA₃ com relação a características específicas do crescimento das bromélias.

Para o GA₃ comercial, a espécie *N. procerum* apresentou maior altura do que *N. innocentii*, enquanto para o GA₃ do EF não houve diferença entre as espécies. O GA₃ de ambas as fontes promoveu o crescimento das espécies de bromélias, sem diferença significativa entre as concentrações de 1,5 e 3,0 g/L.

Isso representa uma atividade parecida do GA₃ comercial e do EF para estas características quando analisado separadamente. Resultados semelhantes foram observados na bromélia *Dyckia maritima* na qual a melhor concentração de GA₃ foi 2,6 mg.L⁻¹, porém nesse caso não foi usada a brotação isolada, mas sim um agrupamento de brotos (Silva *et al.*, 2004).

A aparência das plantas após 50 dias de cultivo com a utilização de EF como fonte de GA₃ pode ser observada na Figura 50.

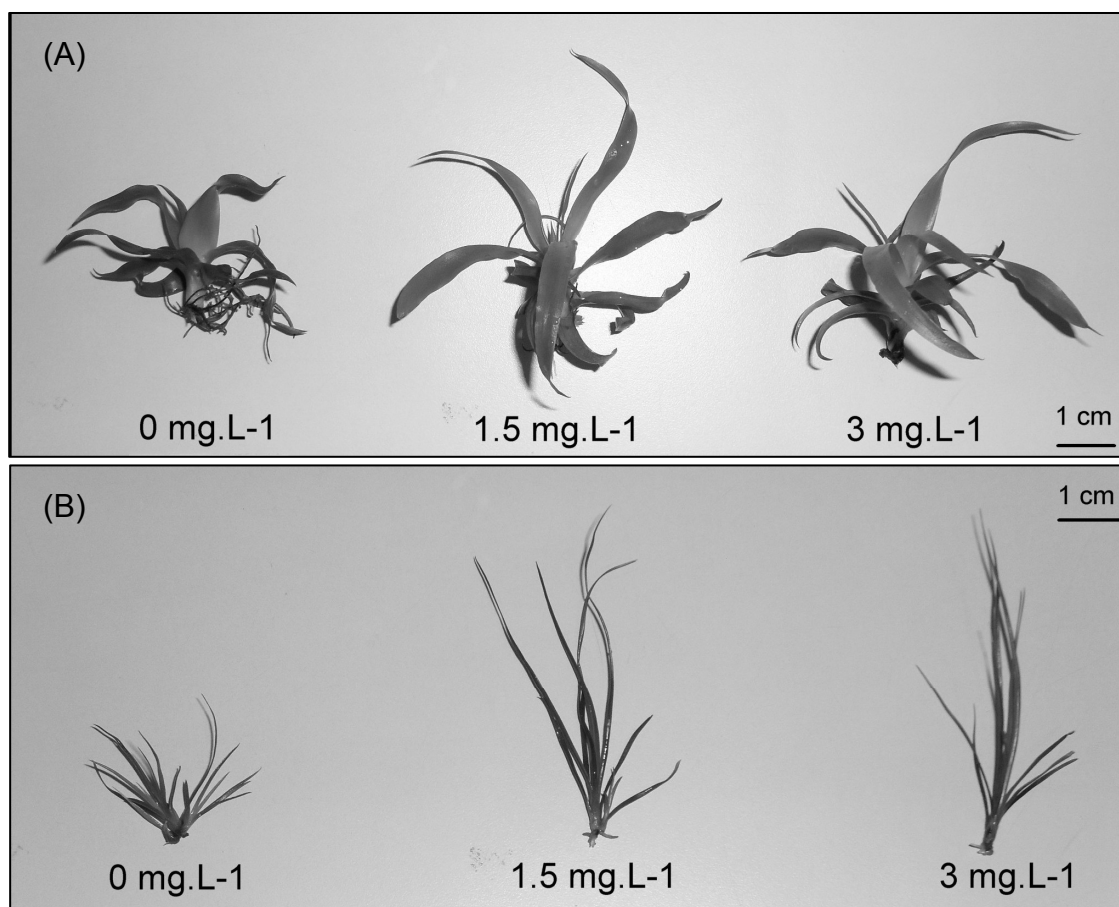


Figura 50 - Plantas micropropagadas de bromélias do gênero *Nidularium* sob diferentes níveis de ácido giberélico oriundo do extrato fermentado (EF) aos 50 dias de cultivo *in vitro*. (A) *N. innocentii* e (B) *N. procerum*

3.2 Estabilidade do EF a Temperatura Ambiente

Existem no mercado diferentes produtos utilizados como fonte de GA₃ que variam na forma e concentração de GA₃. Como exemplos temos o ProGibb^{MR}, vendido na forma de pó com concentrações de 2 e 20%, e o GibGro^{MR} na forma líquida (diluído em álcool isopropílico) com concentrações de 5 a 20%.

Desta forma foram realizados testes de estabilidade do EF a temperatura ambiente devido a possibilidade de comercialização do produto mesmo na forma líquida. A curva de estabilidade é apresentada na Figura 51.

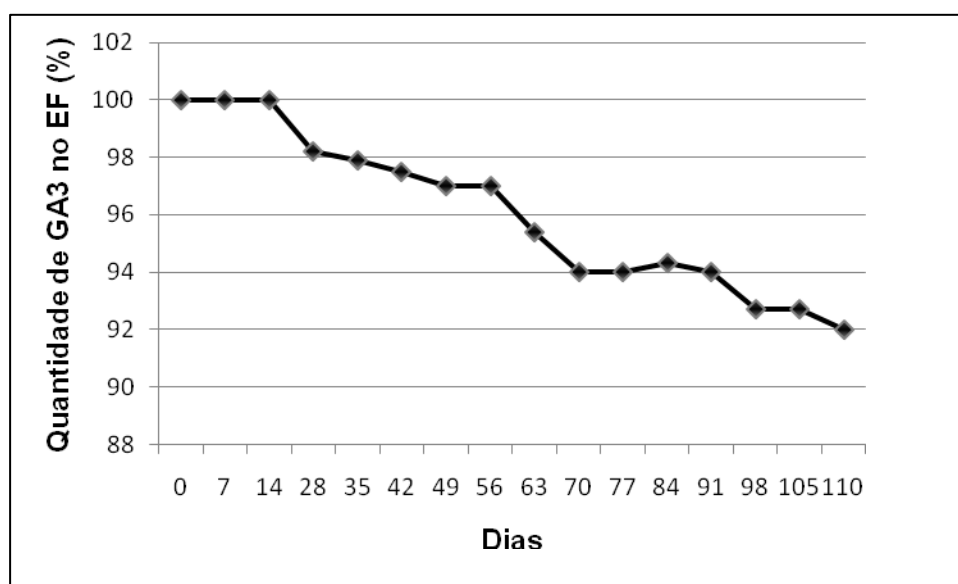


Figura 51 – Curva de estabilidade do EF representada em % de GA₃ presente no EF no decorrer de 110 dias

Observa-se que a quantidade de GA₃ no EF se mantém constante até 14 dias quando se inicia uma queda na quantidade de GA₃ chegando a 92% em 110 dias de estocagem. Machado (2002) observou que durante 40 dias um extrato conseguido da FES de casca de café e bagaço de mandioca, manteve-se estável sem degradação do GA₃, quando mantido sob refrigeração a 5 °C.

Assim a queda observada na quantidade de GA₃ presente no EF foi considerada baixa, de menos de 10% em 110 dias a temperatura ambiente não sendo atingido o tempo de meia vida, além disso, não foi adicionado nenhum tipo

de estabilizante ao EF o que provavelmente possa aumentar ainda mais o tempo de estocagem para um futuro produto.

4. CONCLUSÕES

O EF apresentou resultados promissores para sua utilização como fonte de GA₃ ao ser aplicado nas espécies de bromélia *N. innocentii* e *N. procerum*. Estes resultados dependem da espécie de bromélia e da concentração de GA₃. A altura da parte aérea aumentou para as duas espécies de bromélia estudadas com o uso de GA₃ de ambas as fontes. Com a utilização de EF, houve um aumento no número, percentagem de brotos laterais e folhas, comparado ao obtido com a utilização do GA₃ comercial.

Os estudos com a estabilidade do EF revelaram que a sua utilização ainda é possível mesmo após 110 dias de estocagem a temperatura ambiente. Desta forma estes resultados são bastante promissores comprovando-se a eficiência do produto líquido (EF) obtido da FES com o fungo *F. moniliforme* LPB 03 tendo PC como substrato.

5. REFERÊNCIAS

Batalha M.O. e Buainain A.M. *Cadeias produtivas de flores e mel*. Brasília: IICA: APA/SPA, 2007.

Caldas L.S., Haridasan P., Ferreira M.E. Meios nutritivos. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa. 1998, 87-132.

Cruz C. D. *Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2001, 648p.

Gallo L.A., Crocomo O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO AB; KIMATI H; AMORIM L. (eds). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995; 495-505.

Silva A.L.L., Franco E.T.H., Bisognin D.A., Dornelles E.B., Walter J.M. Ensaio sobre o alongamento de brotos laterais de *Dyckia maritima* Baker dispostos em agrupamentos - Bromeliaceae. *Caderno de Pesquisa Série Biologia*. 2004, v. 16, n. 2, p. 37-46.

Machado C.M.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA₃) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA₃ em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2002.

Mendes G.C., Soares C.Q.G., Braga V.F., Pinto L.C., Santana R., Viccini L.F., Peixoto P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; v 5, 972-974.

Murashige T. e Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962, **15**, 473-497,

Murashige T. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: SKOOG F. (ed). *Plant Growth Substances*. 1974, 426-434.

Rezende J.C., Ferreira E.A., Pasqual M., Villa F., Santos F.C. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.: adição de reguladores de crescimento e sacarose. *Agrarian*. 2009; v 2, 99-114.

Pasqual M., Hoffmann A., Ramos J.D. 2001. *Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações*. Introdução: Situação e Perspectivas. Lavras: UFLA/FAEPE. 2001, 72

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foram estudadas as condições para o desenvolvimento do bioprocesso de produção por FES, extração e purificação do GA₃ em diferentes modelos de biorreatores. Também foram realizados estudos da utilização do extrato fermentado como fonte de GA₃ em meio de crescimento *in vitro* de espécies de bromélia.

A cepa *Fusarium moniliforme* LPB 03 foi selecionada dentre as existentes no cepário do Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal do Paraná. Esta cepa apresentou uma maior capacidade de produção de GA₃ quando utilizado PC como substrato/suporte (5,7 g/kg de PC seca).

A PC se apresentou como um ótimo resíduo a ser utilizado em FES tanto como substrato/suporte quanto como meio para produção de inóculo. A utilização do extrato de PC como meio de produção de inóculo reduziu o tempo de crescimento da cepa em 48 horas.

Com relação à otimização das variáveis do processo de produção de GA₃ em frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão), foi alcançada uma produção de 7,6 g de GA₃/kg de PC seca em seis dias de fermentação, representando um aumento de 33,3% na produção do metabólito.

Quando estudada a aeração e umidade em sistemas de coluna de vidro, com aeração forçada, obteve-se uma produção de 7,34 g de GA₃/kg de PC seca em cinco dias de fermentação, ou seja, um aumento de 15,26% de produtividade do processo. Esta produção foi alcançada com a utilização de baixa aeração (30 mL/min), o que é um dado importante economicamente para um escalonamento do processo. Além disso, nesta etapa foi possível realizar estudos respirométricos que comprovaram o perfil de crescimento para produção de metabólito secundário (caso do GA₃).

As produções alcançadas em ambos os tipos de biorreatores (frascos de Erlenmeyer e colunas de vidro com aeração forçada) foram superiores ao observado em literatura. Assim, as duas condições de aeração estudadas

(aeração por difusão e aeração forçada) se apresentaram como boas perspectivas para um futuro escalonamento e utilização industrial.

Foram realizados testes de purificação do metabólito produzido utilizando diferentes meios para clarificação e concentração. Destes o carvão ativo (CA) apresentou boas perspectivas. Além de seu preço ser inferior ao da sílica C18 e da resina XAD16, também testados nesta etapa, com a utilização de CA, foi obtido um maior rendimento de GA₃ (69,2%) se comparado aos outros dois meios (C18 – 42,6% e XAD16 – 35,2%). As melhores condições estudadas para a purificação do GA₃ foram o tratamento com CA (em coluna com vazão de 80 mL/min), posterior ajuste do pH do extrato clarificado para 1,5-2,0 e extração utilizando 3 vezes o volume de extrato com acetato de etila. O extrato orgânico foi então concentrado e o GA₃ cristalizado.

O extrato sem tratamento com CA foi utilizado como fonte de GA₃ em meio de crescimento de bromélias *in vitro*. Foram obtidos resultados parecidos com os de padrão comercial de GA₃ dependendo da espécie de bromélia estudada. Para ambas espécies houve aumento no número, percentagem de brotos laterais e folhas com o uso de GA₃ do EF. A estabilidade do extrato a ser utilizado como fonte de GA₃ foi estudada, onde foi observada uma queda de apenas 10% após 110 dias a temperatura ambiente.

Estes resultados são bastante promissores indicando a possibilidade de formulação de pelo menos dois produtos comerciais, sendo um purificado, na forma cristalizada, e outro utilizando o extrato fermentado (forma líquida).

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos foram bastante promissores, pois apresentam perspectivas de desenvolvimento de novos trabalhos relacionados à formulação de um produto com possibilidade de produção em escala piloto e industrial. Alguns estudos a serem realizados são apresentados a seguir:

- ✓ Estudo da estabilidade do extrato clarificado e do produto cristalizado;
- ✓ Estudo da composição do extrato fermentado;
- ✓ Bioensaios utilizando o extrato clarificado como fonte de GA₃, em diferentes cultivares de interesse econômico *in vitro* e em campo;
- ✓ Otimização do processo de clarificação e purificação do GA₃ produzido;
- ✓ Estudo de métodos de concentração do extrato;
- ✓ Estudo do processo de cristalização do GA₃ produzido;
- ✓ Estudo econômico dos custos de produção e utilização do novo produto (extrato clarificado e produto cristalizado);
- ✓ Modelagem matemática do processo de produção de GA₃, envolvendo todas as variáveis significativas;
- ✓ Escalonamento do processo de produção de GA₃ por FES.
- ✓ Melhoramento genético do fungo selecionado como bom produtor de GA₃ em FES e fermentação submersa.